

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MECANISMES

D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

ANNEE 1970-1971

SERIE E. N° 223

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES
DES MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES DE
L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Liliane CAILLARD

Titre de la thèse:

LE TRANSFERT DES GROUPEMENTS METHYLES : ROLE DE LA S-ADENOSYLMETHIONINE
ET DE LA METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE. INTERET EN TOXICOLOGIE ET EN
CANCEROLOGIE.

Soutenue le : 2 Juillet 1971

JURY : MM. R. TRUHAUT
JE. COURTOIS
C. BOHUON
A. LEMONNIER
R. PAUL

Président
Examineur
Examineur
Examineur
Invité

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES MECANISMES

D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

ANNEE 1970-1971

SERIE E. N° 223

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES
DES MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES DE
L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Liliane CAILLARD

Titre de la thèse:

LE TRANSFERT DES GROUPEMENTS METHYLES : ROLE DE LA S-ADENOSYLMETHIONINE
ET DE LA METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE. INTERET EN TOXICOLOGIE ET EN
CANCEROLOGIE.

Soutenue le : 2 Juillet 1971

JURY :	MM. R. TRUHAUT	Président
	JE. COURTOIS	Examineur
	C. BOHUON	Examineur
	A. LEMONNIER	Examineur
	R. PAUL	Invité

A la mémoire de ma Mère,

A mon Mari,

A ma Fille, A mon Fils,

A mon Père, A mes Beaux-Parents,

A ma Famille,

A mes Amis.

A la mémoire de son père

A son père

A son père, à son fils

A son père, à son fils

A son père

A son père



A Monsieur le Professeur René TRUHAUT

Membre de l'Académie des Sciences.

Membre de l'Académie Nationale de Médecine.

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle à
la Faculté de Pharmacie de Paris.

Pharmacien en chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine.

Directeur de l'Unité de chimiothérapie de l'Institut
GUSTAVE ROUSSY.

Commandeur de la Légion d'Honneur.

Qui nous a toujours honoré de sa bienveillante attention,
et nous a fait le grand honneur de nous compter parmi
ses élèves.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre
profonde gratitude, de notre respectueux dévouement
et le témoignage de notre fidèle attachement.

A Monsieur le Professeur Jean-Emile COURTOIS

Membre de l'Académie Nationale de Médecine.

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Pharmacien en chef des Hôpitaux de Paris.

Chevalier de la Légion d'Honneur.

Qui a porté un bienveillant intérêt à nos travaux en acceptant
de faire partie de notre Jury .

Nous lui exprimons notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Claude BOHUON

Professeur de Biochimie à la Faculté Mixte de Médecine et
de Pharmacie de ROUEN.

Directeur du Laboratoire de Biologie Clinique et Expérimentale
de l'Institut GUSTAVE ROUSSY de Villejuif.

Qui a été l'instigateur de ce travail et nous a constamment
prodigué en toutes occasions ses encouragements et son savoir.
Qui a su nous guider avec la plus grande bienveillance et la
plus grande patience.

En témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre
respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur Alain LEMONNIER

Professeur de Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Pharmacien en chef des Hôpitaux de Paris.

Qui a bien voulu nous faire l'honneur d'examiner
notre travail.
Qu'il agrée l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Raymond PAUL

Professeur de Chimie à la Faculté Libre des Sciences d'Angers.

Directeur Scientifique de la Société Rhône-Poulenc.

Commandeur des Palmes Académiques.

Officier de la Légion d'Honneur.

Qui nous a honoré en acceptant de faire partie de notre Jury.

Qui nous a accordé sa confiance à la Direction Scientifique de la Société Rhône-Poulenc.

En témoignage de vive gratitude et de profond respect.

A Monsieur le Professeur DENOIX

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris,
Directeur de l'Institut GUSTAVE ROUSSY de Villejuif.

Qui nous a accueilli à l'Institut Gustave ROUSSY et
nous a permis de réaliser ce travail.

Qu'il agrée l'expression de notre profonde gratitude.

A Mlle Mireille RAVON, Mme Gisèle HANIHINA, Mme Marie Françoise GAUCHERELLE.

Que nous remercions, pour leur aide et leur participation
à ce travail.

A tous les membres de l'Unité de Biologie Clinique et Expérimentale de
l'Institut GUSTAVE ROUSSY.

LE TRANSFERT DES GROUPEMENTS METHYLES : ROLE DE LA S-ADENOSYLMETHIONINE ET DE LA
METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE. INTERET EN TOXICOLOGIE ET EN CANCEROLOGIE.

P L A N

- INTRODUCTION

- CHAPITRE I - La S-adénosylméthionine (S-AMe)

I. Propriétés et caractères de la S-AMe

- 1° Hydrolyse
- 2° Stabilité
- 3° Contrôle des solutions

II. Spécificité des stéréoisomères

III. Choix de la technique de dosage

IV. Dosage par dilution isotopique et double marquage

- 1° Principe
- 2° Synthèse de l'acétylsérotone tritiée
 - a) principe
 - b) technique
- 3° Préparation de l'hydroxy-indole-O-méthyltransférase (HIOMT) (EC-2-1-1-4)
- 4° Extraction de la S-adénosylméthionine des tissus
- 5° Les solutions de S-AMe
 - S-AMe ^{14}C
 - S-AMe étalon

V. Dosage par simple dilution isotopique

VI. Conclusion

- CHAPITRE II - La L-méthionine S-adénosyltransférase (MAE)

I. Préparation de l'enzyme

- 1° Préparation I
- 2° Préparation II
- 3° Préparation III

II. Mesure de l'activité MAE

A. Principe

B. Protocole

- 1° Réaction enzymatique
- 2° Isolement de la S-AMe ^{14}C formée
 - principe
 - préparation des colonnes
- 3° Détermination de la S-AMe ^{14}C formée

III. Les inhibiteurs de la réaction

- 1° Le substrat
- 2° Les analogues de la méthionine
- 3° Les produits formés
- 4° Le sélénite de sodium

IV. Conclusion

- CHAPITRE III - Variations du taux de la S-AMe et de l'activité MAE sous l'influence de substances à tropisme hépatique.

I. Le tétrachlorure de carbone

- 1° Protocole
- 2° Variations de la S-AMe dans divers organes
- 3° Mise en évidence de la MAE dans les plasmas de rats
- 4° Variations de la MAE dans le foie et le coeur
- 5° Comparaison des effets de la S-AMe et de la méthionine sur des rats intoxiqués au CCl_4
- 6° Conclusion

II. L'éthionine

- 1° Protocole
- 2° Influence de la dose d'éthionine administrée sur la S-AMe et la MAE
- 3° Evolution au cours du temps de l'effet d'une dose d'éthionine sur l'activité MAE
- 4° Discussion

III. Le sélénite de sodium

- 1° Etude in vivo
 - a) protocole
 - b) variations des activités MAE dans le foie
 - évolution de l'effet en 48 h sur des rats mâles
 - effet en 30 mn sur des rats femelles
 - c) variations des activités MAE - GPT et OCT dans le plasma.
- 2° Etude in vitro
- 3° Discussion

IV. Le B.H.T.

- 1° Administration unique
- 2° Administration répétée
- 3° Discussion

V. Conclusion

- CHAPITRE IV - Variations physio-pathologiques de la S-AMe et de la MAE

I. Etude sur l'animal

- 1° Variations physiologiques
 - a) en fonction de l'espèce
 - b) en fonction de l'organe
 - c) en fonction du sexe

- 2° Influence des facteurs nutritionnels
- 3° Influence des facteurs hormonaux
- 4° Variations pathologiques

II. Pathologie humaine

- 1° Taux de S-AMe dans le sang
- 2° Leucémie
- 3° Tumeurs

III. Discussion et conclusion

- CONCLUSION GENERALE

- BIBLIOGRAPHIE

X
X X
X

I N T R O D U C T I O N

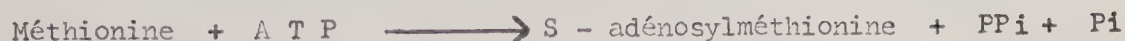
Dans les organismes vivants, il existe de très nombreux composés possédant un ou plusieurs groupes méthyles. Leur importance est considérable. La formation de ces substances méthylées dépend essentiellement des réactions dites de "transméthylation".

HIS (1887) et HOFMEISTER (1894) avaient, les premiers, remarqué que la pyridine et les dérivés du tellure administrés à des animaux étaient méthylés par les tissus renfermant des composés tels que la choline et la créatine. Mais le concept de transméthylation est plus récent et sa nature enzymatique a été reconnue par DU VIGNEAUD (1941), CHALLENGER (1942), BACH (1945). Les transferts de méthyle ont été étudiés dans les organes les plus variés : foie, rein, coeur, thyroïde (BACCARI et FIDANZA 1948), cristallin de boeuf (FIDANZA et BERARDINIS 1948), végétaux et moisissures (CROMWELL 1949-1950), (CHALLENGER 1951), parasites et micro-organismes (CHALLENGER 1951).

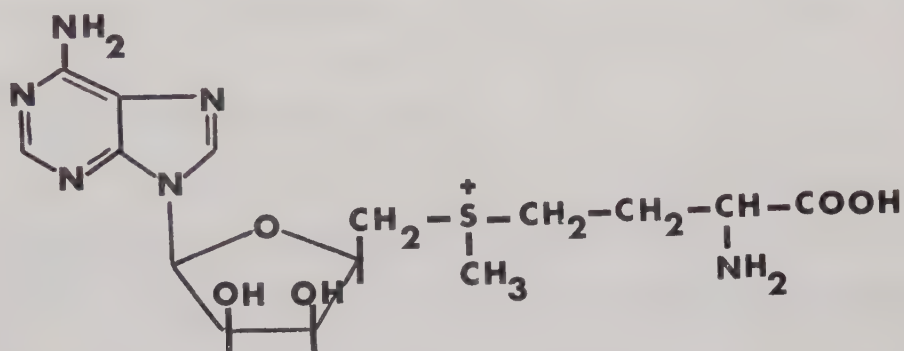
Les travaux de DU VIGNEAUD et coll., en particulier, ont établi que le groupement méthyle de la plupart des substances méthylées est métaboliquement "stable", c'est à dire non transférable sur un accepteur de méthyle. Seules quelques substances méthylées, dans lesquelles le groupement CH_3 est fixé sur un atome d'azote ou de soufre, possèdent au contraire, un groupement méthyle "labile" c'est à dire transférable. Ces dernières substances, apportées par l'alimentation ou synthétisées dans l'organisme jouent ainsi un rôle fondamental comme source physiologique de radicaux méthyle.

La méthionine peut servir de donneur de méthyle au cours des réactions de transméthylation, après activation préalable en S-adenosylméthionine (S-AMe). L'enzyme responsable est l'enzyme activatrice de la méthionine ou méthionine-adenosyltransférase (méthionine-activating-enzyme ou MAE) (EC-2-5-1-6). Cette transformation de la méthionine a été étudiée en utilisant des préparations enzymatiques de foie de lapin, de levure et d'*Escherichia Coli*; la réaction suivant

explique la formation de la S-AMe.



Il n'apparaît pas d'intermédiaires libres au cours de la réaction, en particulier ni ADP, ni adénosine. Cette constatation peut être comprise à la suite des travaux de MUDD (1962) qui a montré que la quasi totalité du tripolyphosphate issu de l'ATP reste fixée à l'enzyme avant d'être hydrolysée en PPi+ Pi



La S-adénosylméthionine se caractérise, au point de vue structural, par la présence d'un groupement méthyl-sulfonium qui possède l'énergie nécessaire aux réactions de transméthylation.

La découverte de la S-AMe en 1952 par CANTONI, a permis de franchir un pas important dans la compréhension de ces mécanismes. La S-AMe constitue le coenzyme nécessaire de nombreuses méthyltransférases (Tableau I). En conséquence, c'est une molécule très importante intervenant dans des réactions cataboliques (détoxification par méthylation), ou anaboliques (synthèse de l'adrénaline - méthylation des RNA).

T A B L E A U 1

PRINCIPAUX COMPOSES METHYLES PAR TRANSMETHYLATION ET POUR LESQUELS L'INTERVENTION
DE LA S-AMe EN TANT QUE DONNEUR DE METHYLE A ETE PROUVEE

N - TRANSMETHYLATION

- Biosynthèse de la créatine à partir de l'acide guanidino-acétique avec intervention de la guanidino-acétate-méthyltransférase.
- Biosynthèse de la choline à partir de l'éthanolamine. La méthylation se fait en 3 étapes comportant la synthèse successive de la monoéthyl-éthanolamine, de la diméthyl-éthanolamine et de la choline.
- biosynthèse de l'adrénaline à partir de la noradrénaline grâce à l'intervention de la phénol-N-méthyltransférase.
- Méthylation des bases puriques :
 formation de la N-méthyladénine à partir de l'adénine
 et de la 1-méthylguanine à partir de la guanine
- Catabolisme de la nicotinamide éliminée par l'urine en méthyl-nicotinamide sous l'influence de la nicotinamide-méthyl-transférase

O - TRANSMETHYLATION

- Synthèse de la mélatonine dans l'épiphyse à partir de la N-acétylsérotonine, sous l'influence de l'hydroxy-indole-O-méthyltransférase.
- Formation de la normétanéphrine à partir de la noradrénaline sous l'influence de la catéchol-O-méthyltransférase.
- formation de la métanéphrine à partir de l'adrénaline sous l'influence de la catéchol-O-méthyltransférase.

S - TRANSMETHYLATION

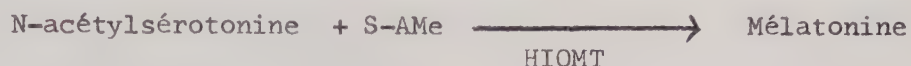
- Catabolisme du thiouracile éliminé dans l'urine en 2-méthylthiouracile
- méthylation de substances non physiologiques telles que le 2-3 dimercapto-propanol- Le β -mercapto-éthanol- L'hydrogène sulfuré.

C - TRANSMETHYLATION

- Méthylation de la cytosine en 5 méthylcytosine

Cependant l'étude du système enzymatique S-AMe-MAE est encore très fragmentaire.

BALDESSARINI et KOPIN en 1963 ont décrit les premiers une méthode suffisamment sensible par dilution isotopique et double marquage, permettant la détermination du taux de S-AMe dans les tissus. Le principe de la réaction, est la méthylation de la N-acétylsérotinine par la S-AMe en présence de l'Hydroxy-indole-O-méthyltransférase (HIOMT) (enzyme extraite de l'épiphyse de boeuf).



MUDD et Coll. en 1965 ont décrit une méthode permettant la mesure de l'activité enzymatique MAE sur de petites quantités de tissus.

Mais en dépit de son importante fonction biologique, peu d'études ont été entreprises sur l'identification et la caractérisation de la MAE, ceci pouvant être dû à la grande instabilité de cette enzyme.

On sait cependant que l'enzyme non purifiée de foie de rat est moins spécifique vis à vis du substrat que l'enzyme bactérien (COX et SMITH 1969). Cependant, la stéréospécificité est très nette à l'égard des isomères D et L de la méthionine. En effet, l'activité relative de la D-méthionine est de 13 % par rapport à la L-méthionine (PAN et TARVER 1967)^b.

Parmi les principaux travaux ayant porté sur les déterminations de la S-AMe et de la MAE, nous citerons ceux de PAN et TARVER (1967)^a sur les variations physiologiques normales chez l'animal, de PAN et coll. (1968) sur l'influence des hormones sexuelles, de BALDESSARINI (1966) sur les variations du taux de S-AMe après administration d'agents anti-dépresseurs de substances inhibitrices de la catéchol-O-méthyltransférase, ainsi que de la mono-amine-oxydase.

D'autres recherches importantes ont essayé de relier les mécanismes de transméthylation à la cancérogénèse. C'est ainsi que la découverte des tRNA surméthylés, a ouvert une nouvelle voie de recherche. TSUTSUI, SRINIVASAN et BOREK (1966) trouvent une activité tRNA méthylase nettement supérieure dans les hépatomes par rapport au tissu normal, et HANCOCK (1967) établit que le nombre de

bases méthylées trouvé dans le tissu tumoral est plus important que dans un tissu normal. Cependant, en 1966 ce même auteur signale une activité MAE extrêmement faible dans l'hépatome.

Par ailleurs, l'activité métabolique importante des tissus tumoraux a permis à MAUBILLE et PIRET (1969) de montrer qu'une tumeur surrénalienne maligne est capable de concentrer la séléno-méthionine marquée au ^{75}Se .

D'ANGIO et Coll. en 1969 sur une hypothèse de BONJON prouve l'affinité des tumeurs neuroblastiques pour la méthionine. En effet, ces tumeurs métabolisent in situ les catécholamines qu'elles synthétisent et cette inactivation se fait grâce à la S-adénosylméthionine.

Pour toutes ces raisons, il nous a paru intéressant de rechercher l'importance des variations quantitatives de la S-AMe et de la MAE.

Dans la première partie de ce travail, le chapitre I se rapporte aux propriétés physio-chimiques de la S-AMe et aux diverses méthodes qui permettent de la doser. Dans le chapitre II, consacré à la MAE, nous envisageons la purification de cette enzyme et la mesure de son activité.

La deuxième partie comprend deux chapitres. Le chapitre III réunit les différentes substances à tropisme hépatique qui ont été étudiées : le tétrachlorure de carbone, l'éthionine, le sélénite de sodium, le di-tertio-butyl hydroxy-toluène. Dans le chapitre IV consacré aux variations physio-pathologiques sont groupés les résultats que nous avons obtenus avec trois types de tumeurs : ganglioneurome, neuroblastome, phéochromocytome, ainsi que les taux de S-AMe dans le sang d'adultes et d'enfants sains ou porteurs de tumeurs diverses.

CHAPITRE I

LA S-ADENOSYLMETHIONINE

Le dosage de la S-AMe repose sur l'utilisation de l'hydroxy-indole-O-méthyltransférase (HIOMT), enzyme qui méthyle la N-acétylsérotinine, pour former la mélatonine.

Bien que la S-AMe soit le co-enzyme de nombreuses méthyltransférases, ce choix se justifie. En effet, la préparation d'HIOMT qui se réalise à partir, de glande pinéale, présente peu de difficultés. En outre, la mélatonine formée est facilement et sélectivement extraite du milieu d'incubation par le chloroforme.

La N-acétylsérotinine est le meilleur substrat de cette enzyme. Ceci a été démontré par AXELROD (1965), qui a étudié la spécificité (plutôt l'affinité), de divers substrats, comme l'indique le tableau suivant :

SUBSTRATS	ACTIVITE RELATIVE *
N-acétylsérotinine	100
5-6 dihydroxyindole	35
Bufoténine	14
N-méthylsérotinine	12
Sérotinine	7
4-hydroxy-N-acétyltryptamine	8
2-hydroxy-tryptamine	0
6-hydroxydiéthyltryptamine	0

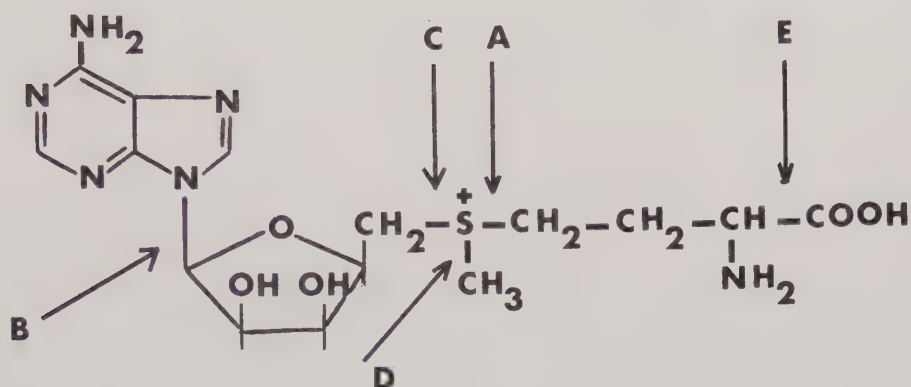
*(Activité relative de l'HIOMT en fonction du substrat. L'activité étant de 100 % pour l'acétylsérotinine).

I. PROPRIETES ET CARACTERES DE LA S-AMe

Avant de présenter le protocole opératoire proprement dit, il est nécessaire de décrire un certain nombre de propriétés et de caractéristiques de cette molécule, car les méthodes de dosage sont très dépendantes de ces dernières.

1° Hydrolyse

Selon les conditions d'hydrolyse, la molécule de S-AMe peut être scindée à différents niveaux. (PARKS et SCHLENK 1958).



- A** : en solution neutre ou par chauffage à pH 4, formation de méthylthioadénosine et d'homosérine.
- A + B** : en milieu acide pH < 4 : dégradation de la méthylthioadénosine en adénosine et méthylthioribose.
- C et B** : en milieu alcalin, il est possible de mettre en évidence une hydrolyse se produisant soit en C : formation de méthionine et d'adénosine, soit en B : formation d'adénine et de S-ribosyl-méthionine. Ce second type de modification est le plus fréquent.
- D et E** : la décarboxylation et la déméthylation de la S-AMe dépendent d'une réaction enzymatique ; aucune réaction analogue n'a pu être mise en évidence par hydrolyse chimique.

S P E C T R E D E L A S - A M e

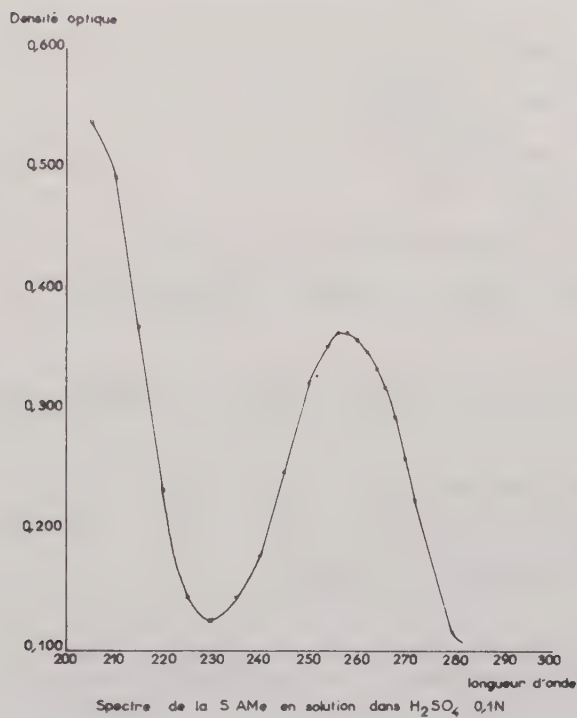


Figure 1 -

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet de la S-AMe purifiée, dans une solution d'acide sulfurique 0,1 N. La lecture est faite contre la solution d'acide sulfurique. La S-AMe a été purifiée par chromatographie bidimensionnelle sur plaque de cellulose.

2° Stabilité

En milieu neutre, acide ou alcalin, cette molécule est scindée. La vitesse de dégradation dépend de la température.

- en solution dans l'acide sulfurique

à pH 2,5-3,5 de 1 à 2 % par mois à - 20° C

2 à 3 % par semaine à 0° C

3 à 4 % par jour à température ambiante.

à pH 4, il est nécessaire de la conserver à - 80° C
à pH plus élevé, elle est instable.

- en solution dans du tampon phosphate 0,05 M à 20° C

en 24 h : 10 % de destruction à pH 6,6

33 % de destruction à pH 7,8

70 % de destruction à pH 8,8

- en solution dans de la soude 0,1 N à 25° C

en 3 minutes 50 % de destruction.

- à l'état sec sous forme d'iodure :

Après une semaine la dégradation est de :

12 % à 3° C

30 % à 24° C

58 % à 37° C.

3° Contrôle des solutions

L'instabilité de cette molécule pose le problème de la conservation et du contrôle de la solution étalon pour les déterminations quantitatives. Différentes techniques choisies selon les nécessités sont utilisables :

- Absorption en U.V. (Fig. 1).

à pH 7 maximum à 260 nm

à pH 1 maximum à 256 nm.

- Electrophorèse sur papier Whatmann n° 1 avec une solution à pH 1,85 (acide formique 1,5 M - acide acétique 0,2 M).

- Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.

Utilisation des résines types Dowex 50, Amberlite.

- Chromatographie sur papier Whatmann n° 3 MM

. n-butanol-acide acétique-eau (12-3-5 V/V) : Rf 0,1

. éthanol-acide acétique-eau (65-1-34 V/V) : Rf 0,25

- Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose (C.C.M.) ou sur papier Kodak K 301 V Silice, sans indicateur de fluorescence.

. 1ère dimension : acétone-eau (4-1 V/V) : Rf 0,1

. 2e dimension : 1 litre de (solution de sulfate d'ammonium 4,55 M + phosphate de sodium 0,1 M pH 6,9) additionnée de 20 ml de 2-propanol : Rf 0,42

La révélation des chromatogrammes se fait, par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 2 % dans l'alcool à 90° et séchage à l'étuve à 80° C pendant 20 minutes.

II. SPECIFICITE DES STEREO-ISOMERES

Il existe peu d'information sur la spécificité biologique des stéréoisomères de la S-Ame. Les dérivés adénosyl de la L-méthionine donnent deux stéréoisomères du soufre (+) et (-).

La (-)S-adénosyl-L-méthionine est obtenue par voie enzymatique. Le composé racémique est obtenu par méthylation de la S-adénosyl-L-homocystéine ou par condensation du 5' méthylthioadénosine avec l'acide 2-amino-4-bromobutyrique.

Les activités des (-) et (±) stéréo-isomères de la S-AMe ont été comparées par ZAPPIA et coll. (1969) sur 4 enzymes:

Imidazole-N-méthyltransférase (EC-2-1-1-8)
 Hydroxyindole-O-méthyltransférase (EC-2-1-1-4)
 Homocystéine-S-méthyltransférase (EC-2-1-1-10)
 S-adénosylméthionine décarboxylase

L'activité du composé racémique est égale à la moitié de l'activité de la (-)S-adénosyl-L-méthionine pour la méthylation de l'histamine par l'imidazole-N-méthyltransférase, et pour la formation de la mélatonine par l'hydroxy-indole-O-méthyltransférase.

Seul le composé (-) est décarboxylé par la S-adénosyl-méthionine décarboxylase.

Par contre, les 2 stéréo-isomères sont aussi efficaces dans la méthylation de l'homocystéine par l'homocystéine-S-méthyltransférase.

La spécificité de cette enzyme est limitée. Elle utilise aussi la S-méthylméthionine comme donneur de méthyle.

III. CHOIX DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE

Les problèmes posés par le dosage de cette molécule, sont dûs à sa très grande instabilité, au manque de technique spécifique de dosage direct de la molécule elle-même, aux faibles quantités présentes dans les milieux biologiques.

Deux types de techniques ont été envisagés. Les premières sont des techniques radio-isotopiques. Les secondes utilisent la fluorescence U.V. du groupement adénosine de la S-AMe.

1) en solution "pure", nous utilisons la fluorescence U.V. du groupement adénosine, après purification par passage sur colonne, ou par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose.

2) dans les milieux biologiques, ces techniques deviennent extrêmement délicates et imprécises. BALDESSARINI (1965) a décrit une technique de double dilution isotopique que nous avons reprise.

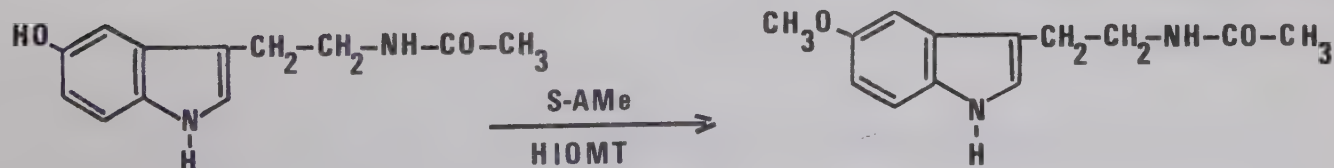
Cette technique présente l'avantage appréciable de pouvoir utiliser pour la réaction enzymatique un homogénat tissulaire brut, sans aucune purification. Elle présente en contre partie, pour un Laboratoire insuffisamment équipé, les inconvénients du double marquage, et de plus elle nécessite la synthèse d'une molécule marquée non encore commercialisée : la N-acétylsérotonine tritiée.

En gardant le principe de la réaction enzymatique et en modifiant quelques conditions techniques, il est possible toutefois d'opérer par simple dilution isotopique. Dans ce cas, il est nécessaire de purifier les extraits de tissus en utilisant après lyophilisation la technique de la chromatoplaque. La S-AMe d'origine tissulaire ainsi isolée et introduite provoque une diminution de l'activité spécifique de la S-AMe ^{14}C . Bien que la quantité totale de mélatonine formée ne soit pas modifiée, on obtient une diminution de formation de mélatonine ^{14}C . Le principe de ce dosage fait apparaître clairement qu'un inhibiteur de l'enzyme introduit dans le milieu jouerait au point de vue du comptage, le même rôle apparent que la S-AMe. Autrement dit, on obtient comme résultat final, la même diminution de radio-activité que l'on introduise dans le milieu, de la S-AMe ou un inhibiteur de l'hydroxy-indole-O-méthyltransférase.

IV. DOSAGE PAR DILUTION ISOTOPIQUE ET DOUBLE MARQUAGE

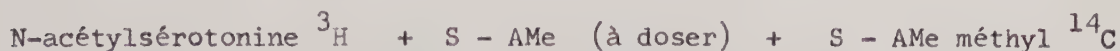
1° Principe

L'hydroxy-indole-O-méthyltransférase, enzyme extraite de l'épiphyse de boeuf, transforme la N-acétylsérotonine en mélatonine. Le groupement méthyle est fourni par la S-adénosylméthionine.



La technique de dosage repose :

- sur une dilution isotopique par la S-adénosylméthionine non marquée présente dans les tissus, de la S-adénosylméthionine ^{14}C ajoutée au milieu et
- sur l'utilisation de la N-acétylsérotanine acétyl ^3H .



La mélatonine formée est extraite sélectivement par le CHCl_3 .

L'activité due au carbone 14 est d'autant plus faible que la S-AMe à doser est en quantité importante.

Le rapport $\frac{^3\text{H}}{^{14}\text{C}}$ augmentera donc en fonction de la quantité de S-AMe non marquée introduite dans le milieu.

2°. Synthèse de la N-acétylsérotanine marquée au tritium

a) - Principe

La sérotanine est acétylée par de l'anhydride acétique tritiée.

b) - Technique

La sérotanine mise en solution est acétylée par de l'anhydride acétique en présence de triéthylamine :

. sérotanine	5 mg
. Eau distillée.....	1 ml
. anhydride acétique.....	100 μl
. triéthylamine.....	100 μl

L'opération est conduite pendant 15 minutes au

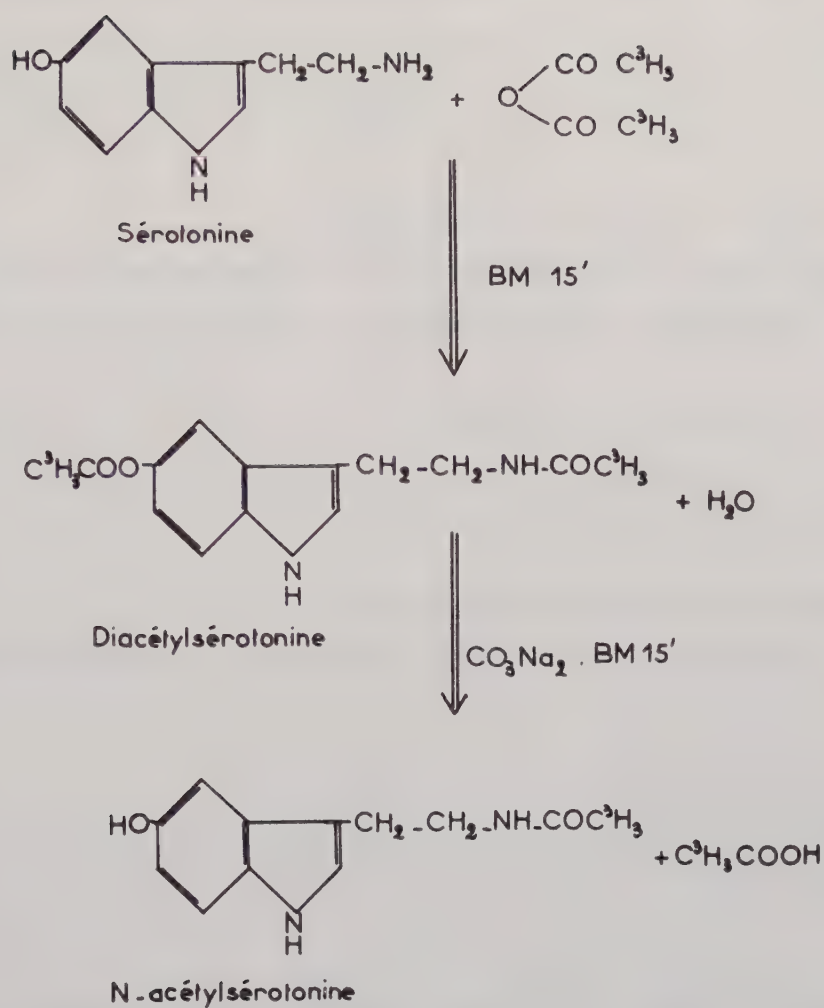


Figure 2 -

Schéma de la synthèse de la N-acétylsérotonine

bain-marie bouillant. Il se forme de la diacétylsérotinine.

L'hydrolyse conduisant à la N-acétylsérotinine est effectuée au bain-marie bouillant par un excès de Co_3Na_2 (vérification du pH), pendant 15 minutes. La diacétylsérotinine est extraite par le CHCl_3 dans une ampoule à décantation. Le résidu aqueux est acidifié par de l'HCl 6 N (vérification du pH) et la N-acétylsérotinine est extraite en plusieurs fois par de l'acétate d'éthyle. L'acétate d'éthyle est alors évaporé à sec.

Le résidu repris par de l'éthanol est mis en chromatographie sur papier Whatmann n° 3 MM, en une série de spots aussi petits que possible sur toute la feuille. Le chromatogramme est développé par le mélange :

. NaCl.....	8 %
. acide acétique.....	1 %

en chromatographie ascendante.

Les zones correspondant à la N-acétylsérotinine (Rf. 0,40) identifiées par des spots témoins, sont découpées et éluées par HCl 0,01 N.

On évalue par la méthode fluorimétrique de FLEMING et CLARK (1965) (fluorescence dans HCl 3 N) la quantité de N-acétylsérotinine formée (fig. 3).

Nous tenons à préciser que par cette méthode fluorimétrique de dosage, on ne peut différencier sérotinine et N-acétylsérotinine. Cependant, cette technique présente l'avantage de la simplicité et nous pensons pouvoir l'utiliser pour trois raisons :

- ces deux produits de Rf. voisins sont préalablement séparés par chromatographie.

- d'autre part, la présence d'une faible quantité de sérotinine n'est pas gênante pour notre manipulation car la sérotinine est un mauvais substrat pour l'hydroxy-indole-O-méthyltransférase (7 % par rapport à la N-acétylsérotinine (AXELROD 1965)).

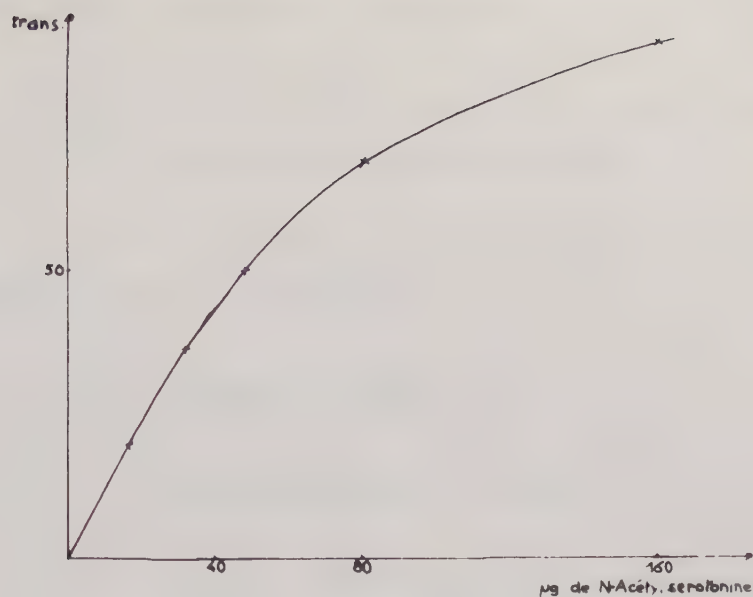


Figure 3 -

La solution préparée est dosée comparativement à une gamme étalon de N-acétylsérotinine, par fluorescence dans HCl 3 N.

Règlage : excitation 315 nm
fluorescence 550 nm

Ajouter dans la cuve échantillon

- N-acétylsérotinine dans HCl 0,01 N
- HCl 0,01 N q.s.p. 1 ml
- HCl 3 N : 1 ml

- Enfin, il n'est pas nécessaire de connaître avec une très grande précision le nombre de micromoles ou de microgrammes d'acétylsérotinine tritiée introduit dans le milieu d'incubation.

Cette manipulation mise au point, avec des produits froids, est alors effectuée avec de l'anhydride acétique tritiée.

Le réactif utilisé provient de New England Nuclear Corp. (N.E.N.C.). Ses caractéristiques sont les suivantes :

- formule $(\text{CH}_3^3\text{CO})_2\text{O}$
 - radio-activité : 100 mCi
 - poids : 25,5 mg dans 0,10 ml de benzène (20 % en benzène)
 - activité spécifique : 400 mCi/mMole
 - . 25 μM correspondent à 10 μl et à 10 mCi, donc 10 μl du réactif correspondent à 8 μl d'anhydride acétique que l'on dilue par 90 μl d'anhydride acétique non marqué.
 - . l'équation de dilution donne : 32,6 mCi/mMole, si l'on avait au départ 400 mCi/mM.
- L'acétylsérotinine obtenue aura donc, quelque soit le rendement de la préparation, une activité spécifique de 32,6 mCi/mMole.

Au stade de reprise par l'éthanol du résidu d'évaporation, la radio-activité mesurée correspond à 75 % de la radio-activité initiale (Fig. 4).

Après la chromatographie, une des bandes est découpée et comptée cm par cm. Les résultats sont les suivants : (Fig. 5)

- somme des 40 comptages..... 2 041 612
- somme du pic acétylsérotinine... 761 096.

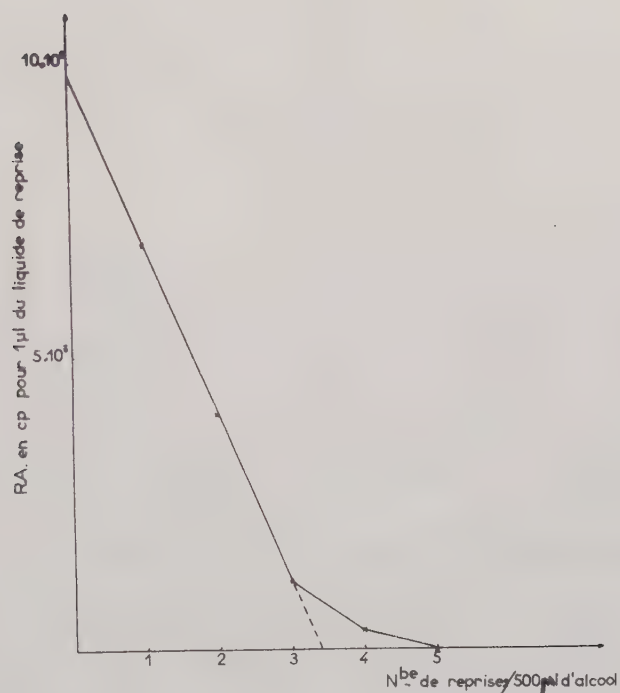


Figure 4 - REPRISE DE L'ACETYLSEROTONINE PAR L'ETHANOL

Après évaporation de l'acétate d'éthyle, le résidu est dissous successivement par 5 fois 500 µl d'alcool à 90°.

Cette dissolution est suivie en prélevant après chaque opération 1 µl de liquide dont l'activité est déterminée.

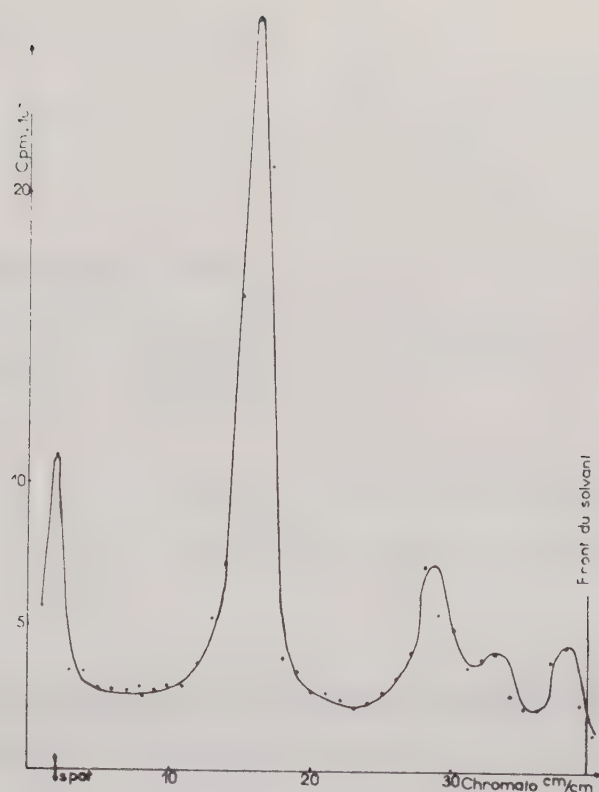


FIGURE : 5

SEPARATION DE L'ACETYL SEROTONINE

Une bande témoin du chromatogramme est découpée cm par cm, du spot au front du solvant.

Chaque languette de papier découpée en petits fragments est placée dans un flacon de comptage.

Chaque tube est compté après addition de 10 ml de liquide scintillant, dont la composition est la suivante :

- | | | | |
|------------------|---------|---|------------|
| - PPO..... | 4 g | } | Packard |
| - POPOP..... | 0,1 g | | |
| - Toluène q.s.p. | 1 litre |) | Carlo Erba |

$$\text{Rendement : } \frac{761\ 096}{2\ 041\ 612} \times 100 = 37,27 \%$$

Radio-activité déposée : 620.10^6 cpm.

$$\text{Il nous reste pour l'acétylsérotinine } \frac{620.10^6 \times 37,27}{100} = 231.10^6$$

Au départ nous avions 921.10^6 cpm.

$$\text{Le rendement final est : } \frac{231.10^6}{921.10^6} \times 100 = 25 \%$$

Il faut rappeler que le rendement théorique maximum ne peut dépasser 50 % puisqu'au premier stade, nous avons formation de diacétylsérotinine.

3° Préparation de l'hydroxy-indole-O-méthyltransférase (HIOMT) (EC 2-1-1-4).

La préparation se fait à partir d'épiphyse de boeuf ou glande pinéale, qui est le tissu le plus riche en HIOMT, et peut être le seul à en contenir.

Toutes les opérations sont conduites à 4° C et le plus rapidement possible.

Les glandes prélevées le matin sont traitées dans la journée et la préparation est mise à dialyser le soir même.

- 16 grammes de glande pinéale sont homogénéisés dans 80 ml de KCl isotonique.
- l'homogénat est centrifugé à 78.000 g pendant une heure et à 4° C dans une ultra-centrifugeuse Beckman Spinco.
- le surnageant est ajusté à pH 5,2 par addition d'acide acétique N
- la solution trouble est placée dans un bain à 47°-49° C, pendant 3 minutes, immédiatement ajustée à pH 6,5 (NH_4OH) et centrifugée à 8 000 g pendant 10 minutes.

- à 50 ml du surnageant, sont ajoutées 40 ml de la solution saturée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ajustée à pH 8,0 (45 % de saturation).
- après centrifugation de 20 minutes à 12 000 g, le surnageant est repris et amené à 68 % de saturation par addition de 60 ml de solution saturée de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.
- le précipité obtenu après centrifugation (20 minutes à 12 000 g) est dissous dans 10 ml de tampon phosphate de potassium 0,0025 M pH 6,5 puis dialysé à 4° C contre 1 litre du même tampon.

La préparation obtenue se conserve relativement bien à condition de la stocker à -20° C en petite quantité, de façon à n'être décongelée qu'une fois au moment de l'emploi.

4° Extraction de la S-adénosylméthionine des tissus

- les tissus sont broyés (Turax) dans 5 volumes d'acide trichloracétique à 10 % dans HCl 0,05 N.
- l'homogénat est centrifugé (Servall) à 23 500 g pendant 20 minutes.
- après centrifugation, l'acide trichloracétique est extrait du surnageant par trois fois 5 volumes d'éther glacé.
- la phase aqueuse contenant la S-AMe est alors répartie en petites quantités et elle est conservée à -20° C.

5° Les solutions de S-AMe ^{14}C

- La S-AMe ^{14}C
 - New England Nuclear Corp..... 55 mCi/mM
 - Tracerlab..... 30 mCi/mM

Nous opérons sur des dilutions nous donnant au départ environ 60 000 cpm par dosage. Ce qui, pour une réaction enzymatique de l'ordre de 10 à 20 % au maximum, donne 6 000 à 12 000 cpm.

Après l'extraction par le CHCl_3 (8 ml) et la reprise (5 ml), il nous reste de 3 500 à 7 000 cpm.

- S-AMe froide (Calbiochem)

Solution de 1 μg pour 10 μl .

Cette solution même conservée à -20°C en ampoules scellées se dégrade très rapidement. C'est pourquoi, il est nécessaire de vérifier l'état du produit avant son emploi. Il s'agit en effet de la solution étalon.

Les solutions de S-AMe servant à l'étalonnage, sont vérifiées par chromatographie bidimensionnelle sur plaque de cellulose Merck sans indicateur de fluorescence :

1ère dimension : acétone-eau (4/1)

2ème dimension : 1 litre de solution ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 4,55 M + phosphate de sodium 0,1 M pH 6,9) additionnée de 20 ml de 2-propanol.

Les tâches sont repérées sous une lampe U.V. la zone de cellulose correspondant à la S-adénosylméthionine est grattée puis éluée par agitation d'une minute dans une solution d'acide sulfurique 0,1 N. La concentration de la solution ainsi obtenue est déterminée rapidement à 256 nm.

$$\frac{\text{D.O.} \times \text{P.M.}}{\epsilon} = \text{concentration de la solution}$$

Les dosages sont effectués en même temps qu'une gamme étalon préparée avec de la S-AMe dont la pureté est ainsi vérifiée.

- Coefficient d'extinction spécifique (ϵ) du corps dissous, est égal par définition, à la densité optique correspondant à une solution de concentration égale à 1‰, vue sous une épaisseur de 1 cm.

- Coefficient d'extinction moléculaire (ϵ) du corps dissous, est égal à la densité optique correspondant à une solution de concentration de 1 molécule gramme par litre, lue sous une épaisseur de 1 cm.

$$\epsilon = E \quad M$$

M = poids moléculaire

6° Protocole opératoire

Une fraction (100 à 500 μ l) de l'extrait aqueux de S-AMe à doser est additionnée d'une petite quantité de S-AMe méthyl ^{14}C (2 μ g).
Après addition de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,8)

de N-acétylsérotinine ^3H (RA 10 fois plus forte que pour la S-AMe ^{14}C)

de HIOMT (500 μ g)

le milieu obtenu est mis à incuber 5 minutes à 37° au bain-marie à agitation.

La réaction enzymatique est stoppée par addition de NaOH N (2 ml).

La N-mélatonine formée est extraite par CHCl_3 (8 ml) par agitation mécanique durant 10 minutes.

Après lavage par la NaOH (N) une partie aliquote (5 ml) est évaporée à sec au bain-marie, directement dans les tubes de comptage.

Le résidu est dissous par 10 ml de liquide scintillant dont la composition est la suivante :

Naphtalène	125	g (Carlo Erba)
PPO.....	12	g (Packard)
POPOP.....	0,30	g (Packard)
Dioxane q.s.p.....	1	l. (Carlo Erba)

Le comptage de chaque flacon se traduit par trois résultats (tritium, carbone 14, activité totale).

REMARQUES

(1) Le temps d'incubation

Le choix en a été déterminé à la suite des résultats obtenus par la réalisation de gammes d'étalonnages effectuées avec des temps d'incubation différents.

En effet, la pente des droites obtenues est d'autant plus forte, que le temps d'incubation est plus faible. La précision de la technique sera donc meilleure avec un temps d'incubation court. (Fig. 6).

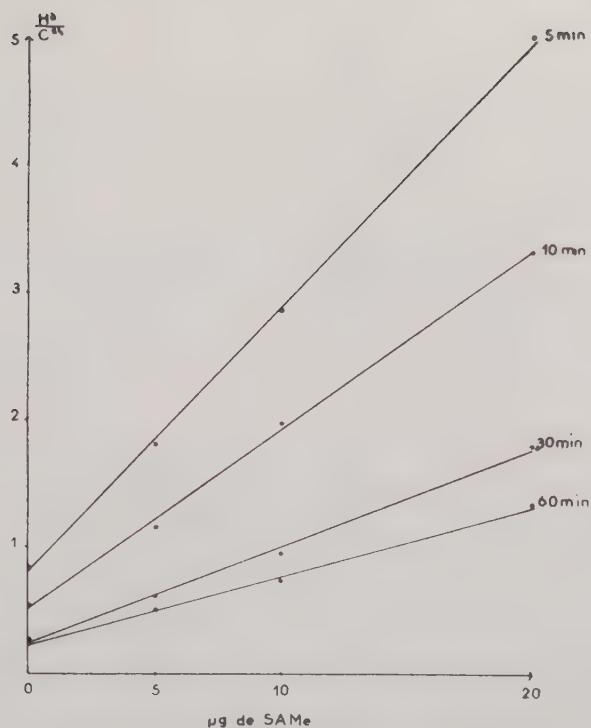


Figure 6 -

Gammes d'étalonnages effectuées avec des temps d'incubation différents. Pour une même quantité de S-AMe le rapport $\frac{H^3}{C^{14}}$ est d'autant plus élevé que le temps d'incubation est plus court.

(2) Essai de la préparation de HIOMT

Le but de cet essai est de déterminer l'activité et donc les quantités d'enzymes à introduire dans les manipulations qui vont suivre. Les conditions seront donc standard, la seule variable étant la quantité d'HIOMT introduite.

Nous obtenons une courbe classique d'activité enzymatique en fonction de la quantité d'enzyme introduite.

(3) Validité de la technique (Fig. 7)

L'emploi d'une solution de S-AMe non marquée va nous permettre de vérifier si nous avons bien proportionnalité entre le rapport $\frac{^3\text{H}}{^{14}\text{C}}$ et la quantité de S-AMe froide.

(4) Corrections des résultats

Chaque série de dosages est accompagnée d'une gamme qui présente l'avantage de nous libérer de toutes les corrections de rendements, de retombées etc.... Par mesure de sécurité, nous vérifions simplement par standard externe le quenching des échantillons. L'expérience ayant montré par standard externe ou interne, que les variations de quenching ne pouvaient être qu'accidentelles (poussière par exemple), mais ne dépendaient pas des dosages.

(5) Caractéristiques du compteur

a) Il est important de préciser quelques caractéristiques particulières du compteur à scintillation liquide utilisé (Beckman).

- comptage automatique à température ambiante
- calcul électronique et enregistrement des résultats
- vérification du quenching par standard externe
- trois canaux permettent par un système à fiches d'avoir : tritium, carbone 14, activité totale.

En effet, en considérant les spectres respectifs du ^3H et du ^{14}C représentés par le nombre d'impulsions enregistrées en fonction de l'énergie des particules, nous constatons qu'il est possible de sélectionner le comptage par la détermination d'un seuil inférieur, et d'un seuil supérieur.

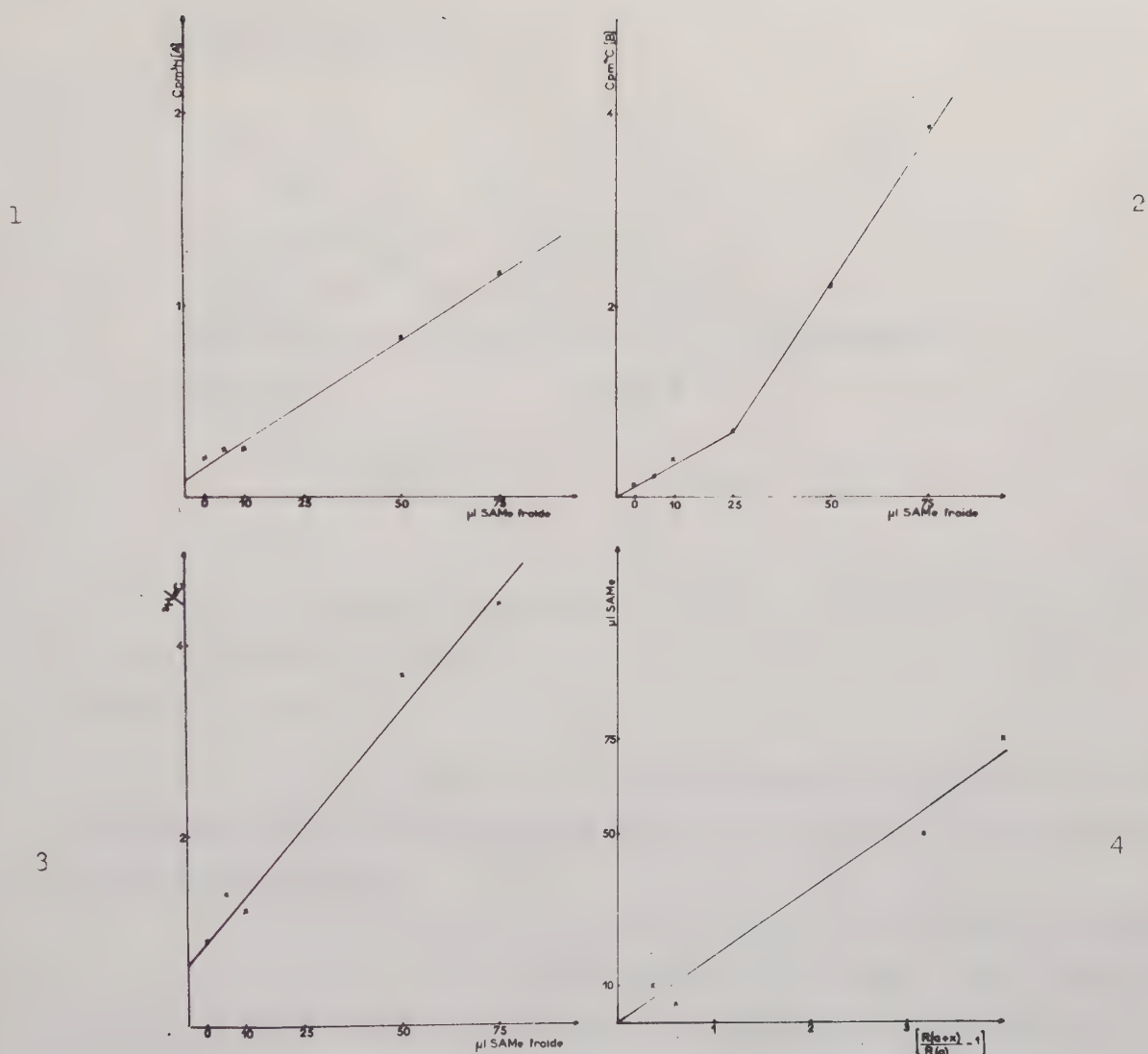
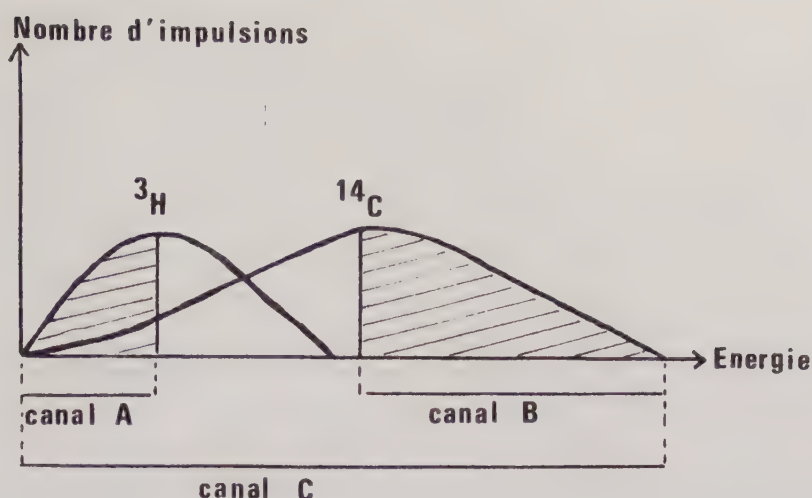


Figure 7 -

- 1 - Radio-activité en ^3H après correction de la radio-activité spécifique.
- 2 - Radio-activité en ^{14}C après correction de la radio-activité spécifique.
- 3 - Rapport $\frac{^3\text{H}}{^{14}\text{C}}$ en fonction de la quantité de S-AME

4 - x (S-AME à doser) en fonction du rapport $\frac{R(a+x)}{R(a)} - 1$

a = S-AME méthyl ^{14}C



Il apparaît clairement qu'il est facile d'obtenir un comptage du ^{14}C sans retombée de ^3H , mais qu'il est impossible d'éliminer complètement la retombée ^{14}C dans le ^3H .

b) nous sommes tenus, en raison même du protocole utilisé pour nos déterminations, d'indiquer deux vérifications qui ont été faites dans les conditions de dosages :

- la proportionnalité de la méthode de comptage
- les retombées du ^{14}C dans le canal A qui augmentent le comptage du tritium. Ces retombées sont en général de l'ordre de 10 %. C'est pourquoi, il est préférable d'avoir une activité en tritium supérieure à l'activité ^{14}C .

V. METHODE PAR SIMPLE DILUTION ISOTOPIQUE

Le principe de la réaction enzymatique est le même. Nous en avons modifié les conditions techniques.

Une fraction (100 à 500 μl) de l'extrait contenant la S-AMe à doser est additionnée d'une petite quantité de S-AMe méthyl ^{14}C (0,36 $\text{m}\mu\text{M}$). Après addition de 1 ml de tampon (phosphate de sodium 0,067 M pH 6,7 additionné de bicarbonate de sodium 0,05 M), de 195 $\text{m}\mu\text{M}$ de N-acétylsérotonine, d'une quantité

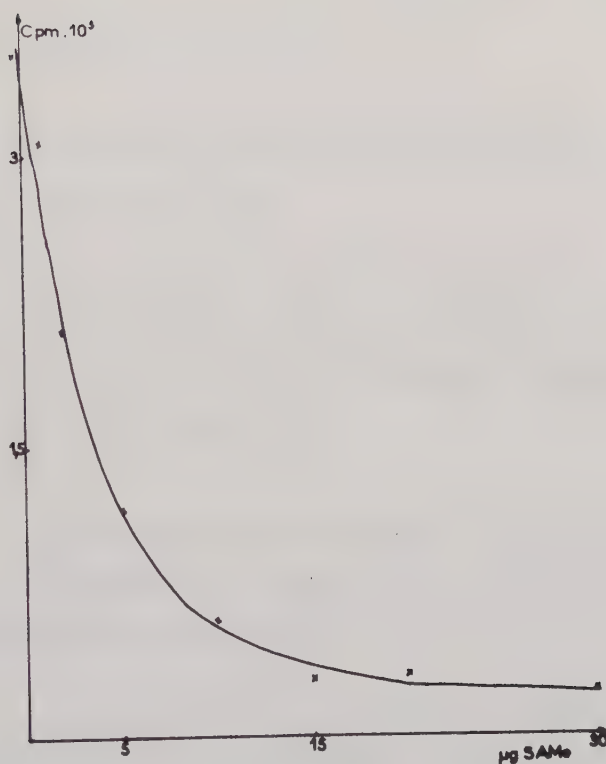


Figure 8 - GAMME D'ETALONNAGE : FORMATION DE LA MELATONINE

Une gamme témoin est préparée selon les conditions standard par addition de S-AMe froide dans le milieu d'incubation.

Les Cpm représentent la mélatonine ¹⁴C formée.

d'HIOMT correspondant à 500 μg de protéines, le milieu obtenu est incubé 30 minutes à 37° dans un bain-marie avec agitation.

L'arrêt de la réaction et l'extraction se font dans les conditions déjà décrites.

Une solution de S-AMe nous permet d'établir pour chaque série de dosages une gamme d'étalonnage.

La quantité de mélatonine ^{14}C formée diminue en fonction des quantités de S-AMe (Fig. 8)

En opérant pour tous les points de la gamme et tous les dosages avec des quantités semblables de S-AMe marquée, nous pouvons lire directement sur la courbe en fonction de l'activité trouvée, la quantité de S-AMe apportée par l'extrait des tissus ajouté.

La formation de mélatonine ^{14}C par méthylation de la N-acétylsérotonine a été vérifiée en étudiant la répartition de la radio-activité des milieux d'incubations après chromatographie (Scanner-Packard) (Fig. 10).

La zone de bonne précision est relativement restreinte (de 1 à 10 μg de S-AMe dans la prise d'essai). Or, les solutions ou les extraits d'organes peuvent avoir des concentrations très variables ; aussi chaque dosage est effectué en double avec des prises d'essais différentes, ce qui présente l'avantage de vérifier le dosage, de mettre en évidence les erreurs pouvant être apportées par certains extraits et surtout d'obtenir une meilleure précision. Des additions de quantités connues de S-AMe au milieu à doser fournissent les résultats suivants :

Surcharge	Récupération	Pourcentage
2 μg	1,79 $\mu\text{g} \pm 0,62 \mu\text{g}^*$	89,3 % $\pm 31,2$ %
7,5 μg	7,05 $\mu\text{g} \pm 0,47 \mu\text{g}$	93,9 % $\pm 6,2$ %

* chaque résultat représente la moyenne de 5 déterminations, assortie de son écart type ($M \pm \sigma$).

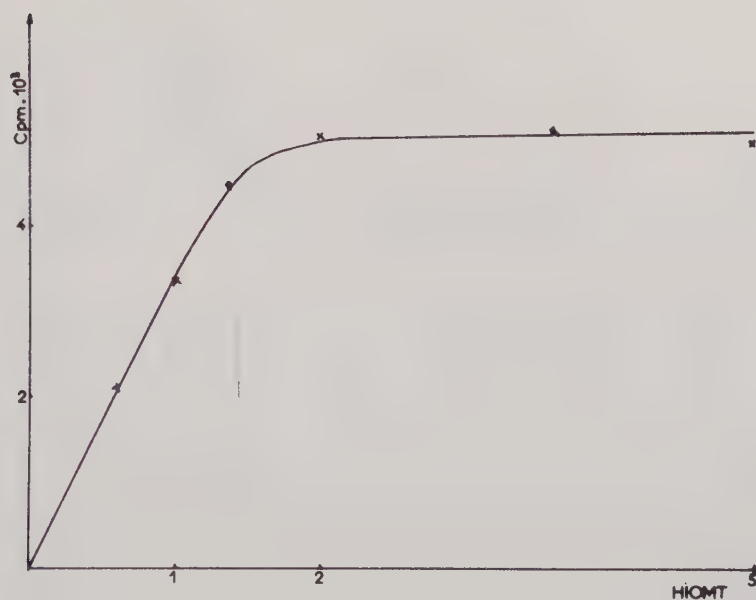


Figure 9 - FORMATION DE MELATONINE EN FONCTION DE LA QUANTITE DE HIOMT

Une quantité fixe de S-AMe méthyl ^{14}C (0,36 μM), est additionnée de 1 ml de tampon, de 195 μM de N-acétylsérotinine et de différentes quantités d'HIOMT.

Incubation de 30' à 37° C.

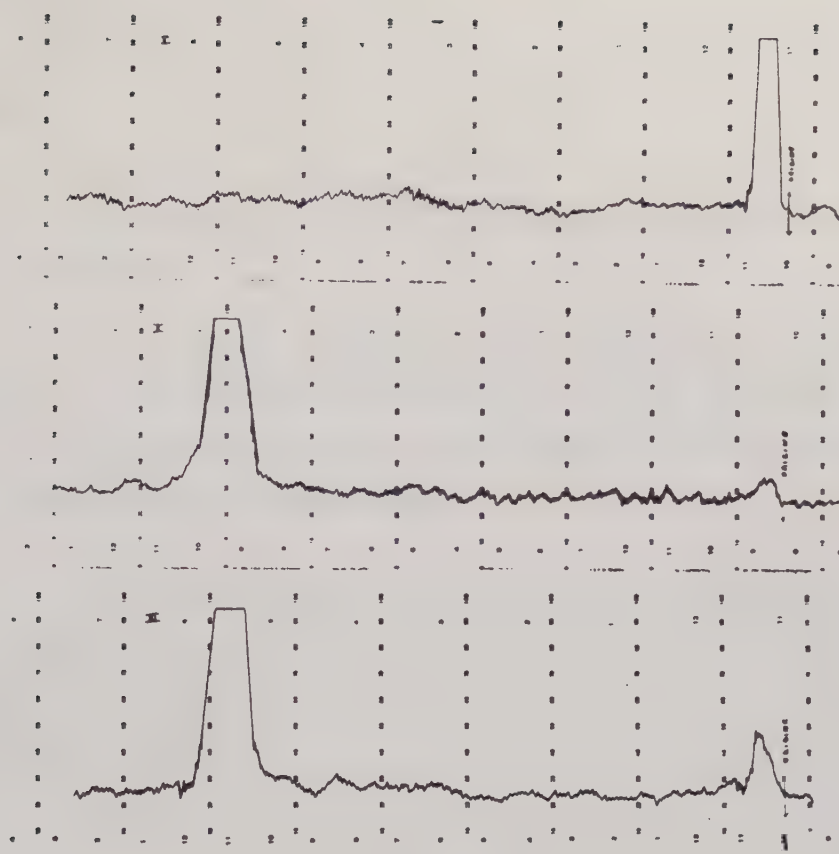


Figure 10 -

Formation de mélatonine ^{14}C

I. incubation B.M. 37° 30 minutes de (S-AMe ^{14}C - tampon N-acétylsérotinine)
Seule la S-AMe est détectée

II. Incubation B.M. 37° 30 minutes de (S-AMe ^{14}C - tampon N-acétylsérotinine
HIOMT) (dépôt de 100 μl).

Formation de mélatonine ^{14}C - diminution très nette du pic radio-actif correspondant à la S-AMe ^{14}C .

III. Idem - dépôt de 200 μl .

L'importance des 2 pics S-AMe ^{14}C et mélatonine ^{14}C est nettement supérieure.

VI. CONCLUSION

Les dosages de la S-AMe sont possibles essentiellement par deux types de techniques.

Les méthodes spectrofluorimétriques d'application aisée sont utilisées pour les vérifications des solutions étalons, car leur sensibilité insuffisante, et la nécessité de purifier au préalable les solutions, leur retirent tout caractère d'application générale.

Les déterminations dans les milieux biologiques ont été rendues possibles grâce à la sensibilité des méthodes radio-isotopiques. Ces techniques sont d'application délicate, mais elles permettent d'effectuer rapidement un grand nombre de dosages.

CHAPITRE II

LA L-METHIONINE-S-ADENOSYLTRANSFERASE

L A L - M E T H I O N I N E - S - A D E N O S Y L T R A N S F E R A S E

La L-méthionine-S-adenosyltransférase (MAE) (EC-2-5-1-6) est l'enzyme spécifique responsable de la formation de la S-AMe.

Les enzymes capables de catalyser la formation de S-AMe à partir de méthionine ont été trouvées dans les tissus de diverses espèces de mammifères, dans des extraits d'*Escherichia Coli* et dans la levure de bière.

La S-AMe préparée par biosynthèse est obtenue à partir de ces levures, qui dans certaines conditions nutritionnelles, accumulent de grandes quantités de cette molécule.

Nous envisagerons successivement l'isolement et la purification de l'enzyme, puis la méthode utilisée pour la mesure de l'activité de la MAE et enfin quelques inhibiteurs de cette enzyme.

Notre travail ayant porté uniquement sur les tissus de mammifères, nous ne ferons que citer brièvement les résultats obtenus à partir des levures ou d'*Escherichia Coli*, dans la mesure où ils permettent de compléter certaines données.

I. PREPARATION DE L'ENZYME

Les préparations enzymatiques utilisées correspondent à des degrés de purification variables selon les cas.

1° Préparation I

Ce mode opératoire est le seul possible lorsque l'on dispose d'une faible quantité de tissus. La technique utilisée est celle de MUDD et FINKELSTEIN (1965). Les tissus sont triturés au mortier avec du tampon phosphate de potassium 0,03 M pH 6,9 et du sable comme abrasif, puis centrifugés à 5 000 g pendant 7 minutes. Le surnageant est utilisé.

2° Préparation II

Le surnageant est fractionné par précipitation avec une solution saturée de sulfate d'ammonium. La fraction comprise entre 30 et 50 % contient le maximum d'activité.

A ce stade la préparation se conserve bien quelques semaines, au congélateur à - 20° C.

Avant le dosage la préparation, dissoute dans du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,9, est dialysée pendant 4 h contre ce même tampon.

3° Préparation III

1° Chromatographie sur Séphadex G 200

La préparation II (précipité 30 à 50 %) est ensuite soumise à une chromatographie sur Séphadex G 200.

Une colonne chromatographique de 100 x 2,5 cm est préparée avec du Séphadex G 200 en suspension dans du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,9. La colonne est équilibrée par passage d'un litre du même tampon renfermant 1 mM de glutathion. On dispose ensuite à la surface du gel un tube applicateur.

La préparation II dialysée, contenant environ 0,400 g de protéines dans un volume maximal de 3 ml est déposée en haut de la colonne. L'élution est réalisée avec le même solvant, tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,9 renfermant 1 mM de glutathion. Des fractions de 3 ml sont collectées. L'opération de remplissage de la colonne ainsi que la chromatographie elle-même doivent être effectuées sous une pression hydrostatique faible. En plaçant la sortie du tube d'écoulement 15 cm au-dessous de la surface du liquide dans le réservoir supérieur, le débit obtenu est sensiblement constant.

L'enzyme est localisée dans les diverses fractions par détermination de l'activité. La Figure 11 représente le schéma d'élution.

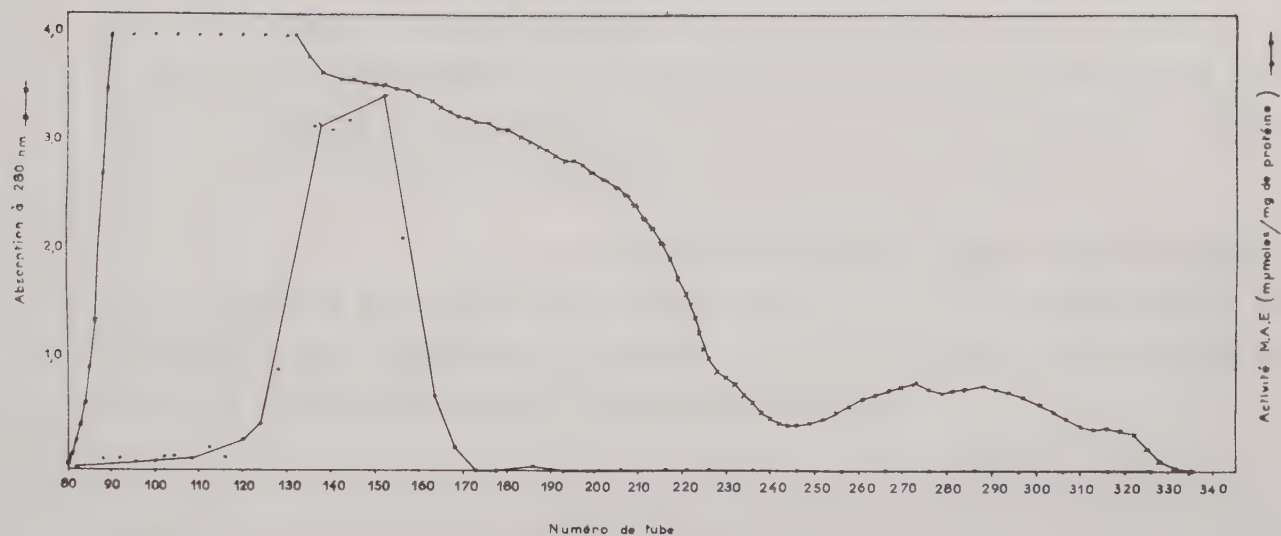


FIGURE 11

Purification de la méthionine-S-adenosyltransférase sur une colonne de Séphadex G 200 (100 x 2,5 cm)

• absorption à 280 nm

• activité méthionine-S-adenosyltransférase

2° Chromatographie sur DEAE-cellulose

La préparation II est soumise à une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose (cellex D, à haute capacité d'échange (0,9 mEq/g) Laboratoires Bio-rad).

5 g de cellex D sont mis en suspension dans 300 ml de tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,9. Après un repos de 15 minutes, le surnageant et les fines particules qu'il renferme sont décantés. L'opération est renouvelée une deuxième fois. Le précipité est ensuite remis en suspension dans du tampon phosphate 0,01 M pH 6,9.

Cette préparation peut ensuite être conservée à 4 ° C jusqu'à son utilisation. La colonne de 4 x 1,5 cm préparée avec cette suspension, est équilibrée par passage de 100 ml de tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,9 contenant 1 mM de glutathion.

La préparation II dialysée contenant environ 0,200 g de protéines est déposée au sommet de la colonne de DEAE-cellulose. Des fractions de 2,5 ml sont collectées. On réalise une élution par étapes, par augmentation de la molarité du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,9 : après le mélange à chromatographier, un rinçage avec le tampon 0,05 M pH 6,9 permet l'élution complète des protéines non fixées sur la colonne. Puis on augmente le pouvoir éluant par passage des tampons 0,1 M et 0,2 M.

La figure 12 montre le profil d'élution de la chromatographie sur cellex D. L'enzyme est éluee par le tampon 0,2 M. Les fractions ayant les plus grandes activités spécifiques sont réunies et forment la préparation III.

3° L'Ampholine

La préparation III obtenue par chromatographie sur DEAE-cellulose est fractionnée par séparation des protéines au point isoélectrique sur un appareillage LKB 8100 Ampholine, l'Ampholine étant constituée d'un mélange de différents acides aliphatiques polyamino-polycarboxylique, permettant l'obtention dans des conditions déterminées d'un gradient de pH. Nous avons utilisé pour les essais préliminaires une Ampholine 3-10 qui nous a permis de retrouver l'activité MAE dans la zone de pH 4,6. Nous avons ensuite opéré avec une Ampholine 3-6.

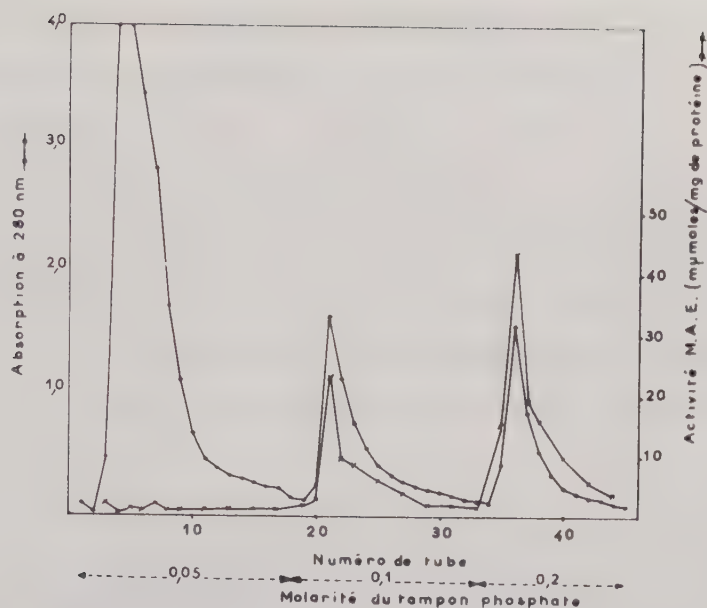


FIGURE 12

Purification de la méthionine-S-adénosyltransférase sur une colonne de DEAE-cellulose (5 x 1,5 cm)

• absorption à 280 nm

x activité méthionine-S-adénosyltransférase.

4° Résultats

L'élution des protéines lors des chromatographies est suivie par mesure de l'absorption à 280 nm des différentes fractions. La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Lowry (1951) avec, comme protéine étalon, de l'albumine de boeuf. Les courbes d'étalonnage sont réalisées selon le cas, en présence de tampon phosphate, ou de glutathion, afin de tenir compte de l'interférence de ces substances dans le développement de la réaction de Lowry.

Il nous est apparu très vite que la MAE est une enzyme très labile. Elle perd, en effet, très rapidement une grande partie de son activité. Nous avons pu limiter l'inactivation de l'enzyme en cours de purification en manipulant très rapidement et en particulier en prenant soin de ne pas laisser l'enzyme en attente entre chaque étape.

II. MESURE DE L'ACTIVITE MAE

Tous les procédés utilisés, qu'ils soient radio-isotopiques ou non, font appel à la réaction suivante :



Deux possibilités sont offertes : dosage soit de la S-AMe, soit du phosphate libéré.

1° Principe

La méthode la plus sensible est la méthode radio-isotopique du dosage de la S-AMe appliquée pour la première fois par MUDD et FINKELSTEIN en 1965. C'est cette méthode que nous avons retenue et adaptée. La mesure de l'activité MAE consiste en une transformation de la L-méthionine méthyl ^{14}C en S-adénosylméthionine méthyl ^{14}C et séparation de ces 2 produits radio-actifs par passage sur une colonne de résine A G 50 W X 4 (NH_4^+) 200 à 400 mesh.

2° Protocole

a) Réaction enzymatique

Le milieu d'incubation standard renferme dans un volume final de 0,45 ml, 60 μ moles de tampon tris-HCl pH 8,2, 80 μ moles de chlorure de potassium, 120 μ moles de chlorure de magnésium, 7,2 μ moles d'adénosine triphosphate neutralisée, 1,6 μ moles de glutathion neutralisé, 0,12 μ moles de (-)S-adénosyl-L-méthionine, 59 μ moles de L-méthionine méthyl ^{14}C (150 000 cpm). Après incubation à 37° C durant 30 minutes, la réaction est arrêtée par addition de 10 ml d'eau glacée.

b) Isolement de la S-AMe ^{14}C formée

Technique

Une fraction aliquote de 5 ml est passée sur une colonne de résine A G 50 W X 4 (NH_4^+) 200 à 400 mesh.

La méthionine est éliminée par lavage avec environ 20 ml d'eau.

La S-AMe est éluée par 10 ml d'une solution ammoniacale 3 N.

L'éluat est constitué de S-AMe et de ses produits de dégradation.

Préparation des colonnes

La résine A G 50 W X 4 (200 à 400 mesh) forme hydrogène, est mise en suspension dans du tampon acétate de sodium, ammoniacale (0,1 M pH 9).

La résine est déposée sur une colonne pourvue d'un tampon de laine de verre à son extrémité inférieure, sur une hauteur de 2 cm pour un diamètre de 0,9 cm.

L'efficacité de séparation de la méthionine a été vérifiée, en suivant ml par ml l'élution de deux colonnes, sur lesquelles nous avons déposé sur l'une un milieu d'incubation témoin, sur l'autre un milieu représentant un dosage. Cette efficacité est parfaite car les derniers ml de lavage, donnent des valeurs correspondant au mouvement propre. Les produits radio-actifs sont élués en totalité. La somme des activités des différents tubes correspond à l'activité déposée sur la colonne. (Fig. 13)

c) Détermination de la S-AMe ^{14}C formée

L'éluat ammoniacal est évaporé à sec.

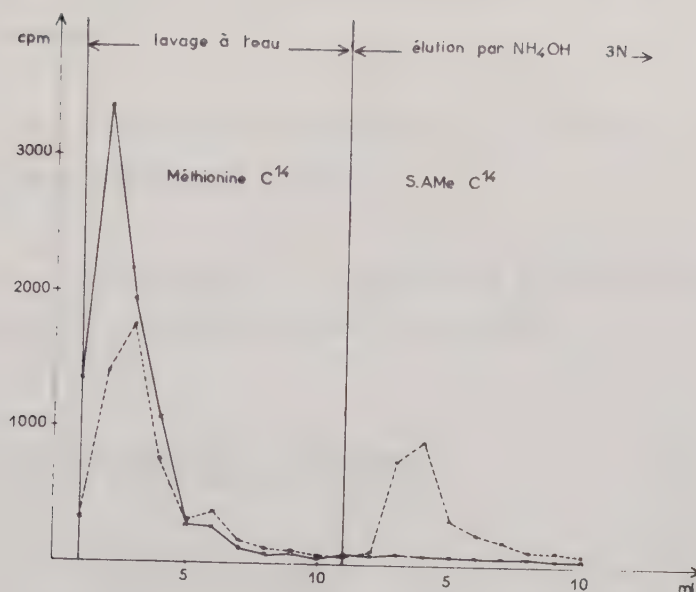


FIGURE 13

EFFICACITE 'DE LA RESINE A G 50 W X 4 (200 à 400 mesh) (NH_4^+)

- milieu d'incubation témoin sans enzyme. Seule la Méthionine ^{14}C apparaît.
- milieu d'incubation avec enzyme. Mise en évidence de 2 pics radio-actifs. La somme des activités de ces 2 pics correspond à l'activité du pic obtenu sans enzyme.

Le résidu repris par 10 ml de liquide scintillant, est compté dans un compteur à scintillation liquide.

Connaissant l'activité et le nombre de millimicromoles de L-méthionine introduite dans le milieu d'incubation, on peut calculer, après avoir mesuré l'activité du produit élué par l'ammoniaque 3 N, la quantité de S-AMe formée.

L'activité enzymatique est exprimée en μ moles de S-AMe formée/mg de protéines/37° C/30 minutes.

La figure (14) représente l'activité MAE en fonction du temps d'incubation à 3 concentrations de protéines.

III. LES INHIBITEURS DE LA REACTION

1° Le substrat

Cette expérimentation a été faite avec l'enzyme purifiée au stade de la préparation II.

La L-méthionine est ajoutée dans le milieu d'incubation standard en quantités croissantes allant de 59 μ M à 3580 μ M. Très rapidement on obtient l'activité maximale (Fig. 15). Devant ces résultats assez inhabituels, nous avons recommencé en portant le milieu d'incubation de 0,450 ml à 4,5 ml : ainsi tous les facteurs étaient les mêmes, sauf la molarité de la L-méthionine, et la concentration du milieu en protéines (nous avons introduit la même quantité de préparation enzymatique). Les activités en μ M de S-AMe formée/mg de protéines, ainsi obtenues sont nettement supérieures à partir de 590 μ M de méthionine, mais néanmoins on assiste à un aplatissement de la courbe à la même concentration molaire de méthionine.

Il paraît difficile de déterminer si ce phénomène est dû à l'augmentation de la concentration de la méthionine ou à la S-AMe formée.

La préincubation de l'enzyme avec la S-AMe en quantité correspondant à celle théorique formée, avant l'addition de 177 μ M de méthionine, n'a pas d'influence sur le dosage.

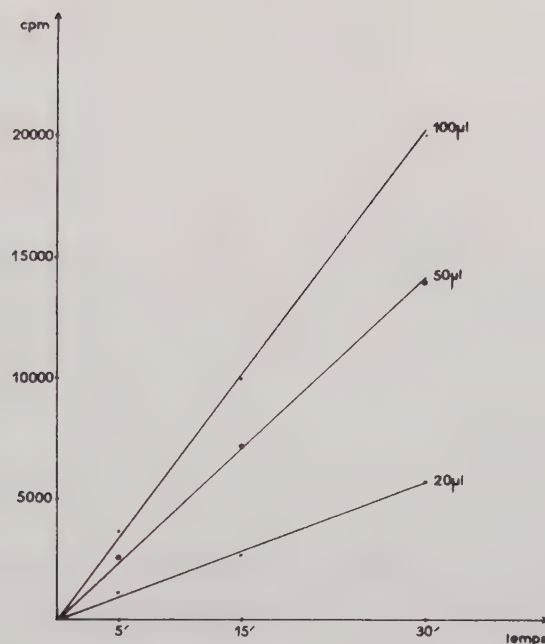


FIGURE 14

Activité MAE en fonction du temps d'incubation à 3 concentrations de protéines.

L'activité MAE est exprimée en cpm correspondant à la quantité de S-AMe ^{14}C formée.

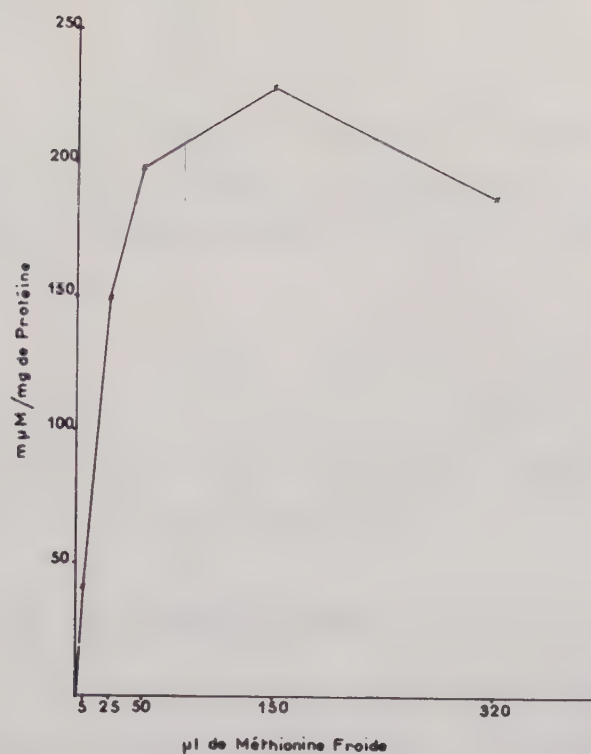


FIGURE 15

Rapport entre l'augmentation de la méthionine et l'activité
méthionine-S-adenosyltransférase obtenue

Résultats exprimés en mM de S-AMe formée/mg de protéines.

2° Les analogues de la méthionine

PAN et TARVER (1967)^b ont comparé différents substrats possibles de la MAE de foie de rat. Les résultats sont représentés dans le Tableau 2.

Il apparaît nettement que si l'enzyme non purifiée n'est pas très spécifique vis à vis de son substrat, on constate par contre une stéréospécificité très nette à l'égard des isomères D et L : c'est ainsi que l'activité relative de la D-méthionine est de 13 % par rapport à celle de la L-méthionine.

Le problème a été repris d'une autre façon par COX et SMITH en 1969 qui ont étudié l'inhibition de la MAE de foie de rat (Tableau 3), et qui ont montré que cette enzyme apparaissait comme moins spécifique que celle obtenue à partir de matériel bactérien.

3° Les produits formés

La S-AMe et la S-adénosyléthionine (S-AE) apparaissent comme de meilleurs inhibiteurs de la MAE que les analogues de la méthionine.

MUDD (1959) a démontré la liaison de la S-AMe à l'enzyme et STEKOL et coll. (1963), émettent l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition identique pour la S-AE.

S-AMe et S-AE ont une action de type compétitif.

De grandes quantités d'éthionine sont nécessaires pour inhiber l'activité MAE, et il est prouvé que la S-AE peut être formée à partir d'éthionine, aussi l'inhibition provoquée par l'éthionine après incubation prolongée pourrait être en partie due à la S-AE formée.

4° Le Sélénite de Sodium

L'étude du sélénite de sodium in vitro a été effectuée sur une préparation de foie de lapin partiellement purifié, par précipitation par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Nous avons observé une inhibition de 94 %.

T A B L E A U 2

COMPARAISON DE DIFFERENTS SUBSTRATS DE LA MAE DE FOIE DE RAT (PAN et TARVER 1967)^b

SUBSTRAT	Km	Activité relative
L-méthionine	0,91 ^(a)	100
L-sélénométhionine	0,51	54
L-éthionine	10,4	37
DL-sélénoéthionine	7,1	30
D-méthionine	42	13
D-sélénoéthionine	(b)	10
D-éthionine	(c)	0 ^(c)

a) D'autres valeurs du Km ont été déterminées

- en 1958 - 2,2 mM par MUDD et CANTONI
- en 1965 - 0,58 mM par MUDD

b) Les Km n'ont pu être déterminés en raison de la faible activité et solubilité de ces produits.

c) La D-éthionine à une concentration de 20 mM donne 8 % de l'activité de la L-méthionine à 10 mM.

T A B L E A U 3

INHIBITION DE LA MAE DE FOIE DE RAT (COX et SMITH 1969)

INHIBITEURS	INHIBITION %
DL-trifluorométhionine	70
L-éthionine	56
DL-norleucine	30
DL α - méthylméthionine	23
S-méthylcystéine	20
S-éthylcystéine	14
Sans inhibiteur	0

Chaque inhibiteur se trouve dans :

- le milieu à une concentration de $1,33 \cdot 10^{-2}$ Molaire

- la méthionine à la concentration de $1,29 \cdot 10^{-5}$ Molaire

pour une concentration $1.10^{-3}M$, de 74 % pour $1.10^{-4}M$. Le Sélénite de sodium n'a pas d'effet à $1.10^{-5}M$.

Selon le tracé de Lineweaver et Burk, l'inhibition produite par le sélénite de sodium à différentes concentrations, apparaît être de nature compétitive.

IV. CONCLUSION

L'étude de la MAE des tissus de rats après intoxication et l'étude de la MAE des tumeurs seront conduites sur des préparations de type I.

Les préparations de type II et III ont été réalisées à partir de foies de lapins, dans le but de préciser le mécanisme de la réaction de formation de la S-AMe. Avec ces préparations, nous avons étudié l'effet d'une augmentation de concentration de la méthionine ainsi que l'action in vitro des différentes substances administrées in vivo.

Dans le foie, la MAE est localisée dans la fraction soluble de la cellule. Nous n'avons pas trouvé d'activité dans la fraction microsomique obtenue par centrifugation à 100 000 g pendant 1 heure, en milieu KCl isotonique.

In vitro les produits résultant de l'action de la MAE, S-adénosylméthionine et S-adénosyléthionine peuvent, à partir d'une certaine concentration dans le milieu, inhiber leur propre synthèse.

CHAPITRE III

VARIATIONS DU TAUX DE S-AMe ET DE L'ACTIVITE MAE

SOUS L'INFLUENCE DE SUBSTANCES A TROPISME HEPATIQUE

LE TETRACHLORURE DE CARBONE

Nous avons d'abord utilisé le CCl_4 , dont on connaît la toxicité et en partie le mode d'action.

L'intoxication par le tétrachlorure de carbone entraîne des lésions de l'ultrastructure de la cellule hépatique dont la chronologie a été très bien étudiée. Parallèlement, à ces phénomènes, qui s'échelonnent sur vingt quatre à soixante douze heures, une augmentation de l'activité de certaines enzymes plasmatiques a été mise en évidence par de nombreux travaux parmi lesquels ceux de BRUNS et NEUHAUS (1955), CORNISH et BLOCK (1960) REES et SINHA (1960)

Le taux sérique de chaque enzyme dépend de nombreux facteurs liés à sa nature, à sa localisation hépatique plus ou moins étroite, à sa présence dans tel ou tel organite intracellulaire.

D'autre part, les variations de l'amino-acidurie et de l'acido- acidémie ont été étudiées par KNAUFF et WINDSHEINER (1960), CORNISH et RYAN (1964), TRUHAUT et DELARUE (1965).

En effet, le foie étant le principal siège de la synthèse des protéines plasmatiques, ces études pouvaient permettre d'évaluer l'importance de l'atteinte hépatique. Il est possible d'invoquer soit la libération du matériel enzymatique à la faveur de la lyse cellulaire, soit une perméabilité anormale de la membrane cellulaire.

Dans ce travail, nous exposerons les résultats obtenus dans l'étude de l'intoxication par le tétrachlorure de carbone réalisée dans diverses conditions expérimentales.

Notre travail comportera quatre parties : la première sera consacrée aux modifications du taux de la S-AMe dans différents organes. Dans la seconde partie, nous étudierons la possibilité de libération de la MAE dans le plasma des rats par suite de l'atteinte hépatique. Dans la troisième partie

nous rechercherons une variation de l'activité MAE dans le foie et le coeur. Nous envisagerons enfin, dans la quatrième partie, la comparaison de la protection pouvant être apportée par l'administration de méthionine ou de S-AMe.

1° Protocole

Des rats mâles Sprague-Dawley de 200 à 250 g reçoivent par voie intra-péritonéale, 0,5 ml de CCl_4 dilué dans 0,5 ml d'huile de paraffine. Les rats témoins reçoivent uniquement l'huile de paraffine. Après anesthésie à l'éther, le sang prélevé sur héparine par ponction de l'aorte est centrifugé. Les organes sont débarrassés du sang qui peut les souiller à l'aide de gaze. Aussitôt après l'obtention des prélèvements, toutes les opérations sont effectuées à + 4° C.

2° Variations de la S-AMe dans divers organes

Pour cette étude, les animaux ont été sacrifiés 4 h après l'injection. Cette expérimentation a nécessité 20 rats : 10 témoins et 10 traités. Les résultats sont représentés par la figure 16.

Les variations sont peu importantes. Nous noterons simplement une diminution dans le foie, une augmentation dans le coeur.

3° Mise en évidence de l'activité MAE dans le plasma des rats

Après administration de CCl_4 à des rats, dans les mêmes conditions que précédemment, la MAE peut être mise en évidence dans le plasma. Cette activité augmente en fonction du temps parallèlement à l'activité transaminasique GPT. Le maximum est atteint entre la 18e et la 24e heure, comme cela peut être constaté dans le Tableau 4.

Les mesures des activités GPT ont été effectuées à l'aide des "Biochimica Test Combinations" (Boehringer). La formation de pyruvate est dosée par le système LDH-NADH. La diminution de l'absorption due à la formation de NAD est lue à 366 nm. L'emploi d'une cuve thermostatée permet la détermination de l'activité de façon précise.

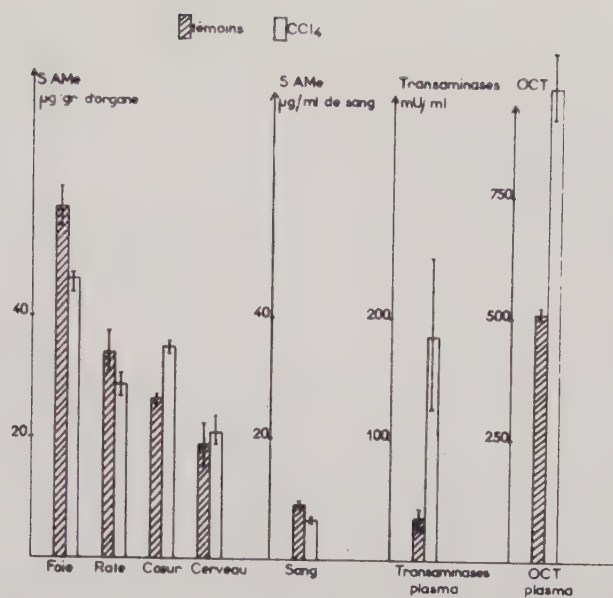


FIGURE 16

Variations du taux de S-AME 4 h après administration de CCl₄ dans divers organes et dans le sang total. Les variations des activités des transaminases GPT et de l'OCT dans le plasma des mêmes animaux sont représentées à titre de comparaison.

T A B L E A U 4

ACTIVITE MAE ET GPT DANS LE PLASMA DE RATS TRAITES AU CCL₄

	MAE dans le plasma m μ M/ml/30'/37°	G.P.T. μ M/ml/mn/25°
1 h	0	24,5
	0	24,5
	0	24,5
3 h 30	0	42,5
	0	9,0
	0	33,5
	0	36
6 h	1,8	70
	0,79	69
18 h 30	14,9	1120
	18,4	1440
	1,91	523
	1,11	1496
	1,55	1050
24 h	1,8	739
	3,9	1873
	13,2	-
	15,0	1340
40 h	8,09	112
	0,72	82
	0,29	-

* L'activité MAE est exprimée en m μ M de S-Ame formée, par ml de plasma, en 30 minutes et à 37°, dans les conditions standards.

Le plasma est introduit dans le milieu d'incubation sans préparation.

Nous avons comparé les activités MAE du plasma et du sang total, d'un animal traité au CCl_4 et sacrifié à la 24^e heure.

Sang total*.....	7,71 $\mu\text{M}/\text{ml}/30 \text{ mn}$
Plasma.....	15,06 $\mu\text{M}/\text{ml}/30 \text{ mn}$

* 1 ml de sang total + 5 ml de tampon phosphate de potassium 0,03 M pH 6,9 sont homogénéisés au Turax puis centrifugés à 5 000 g pendant 7 minutes. Une petite fraction du surnageant est introduite dans le milieu d'incubation standard. Le résultat est donné en μM de S-AMe formée par ml de sang total pour une incubation de 3 minutes à 37 °.

4° Variations de la MAE dans le foie et le coeur

Parallèlement, nous avons montré que les dosages effectués sur le foie permettent d'observer une diminution de la MAE d'environ 50 % au temps 18 h 30.

Rats témoins :	561,04 $\mu\text{M}/\text{g}$ d'organe/30 mn
	59 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine/30 mn
Rats intoxiqués :	256,45 $\mu\text{M}/\text{g}$ d'organe/30 mn
	29 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéine/30 mn

(chaque valeur représente la moyenne des taux obtenus sur 4 rats).

Par contre, les dosages effectués sur les coeurs n'ont pas révélé de changement au temps 18 h 30.

Rats témoins :	5,64 $\mu\text{M}/\text{g}$ d'organe/30 mn
Rats intoxiqués :	5,24 $\mu\text{M}/\text{g}$ d'organe/30 mn.

5° Comparaison des effets de la S-AMe et de la méthionine sur des rats ayant reçu une dose de CCl_4

L'administration à des rats d'une seule dose de CCl_4 provoque une augmentation des activités GPT et GOT dans le plasma. Il était donc intéressant de comparer l'action de la méthionine et de la S-AMe

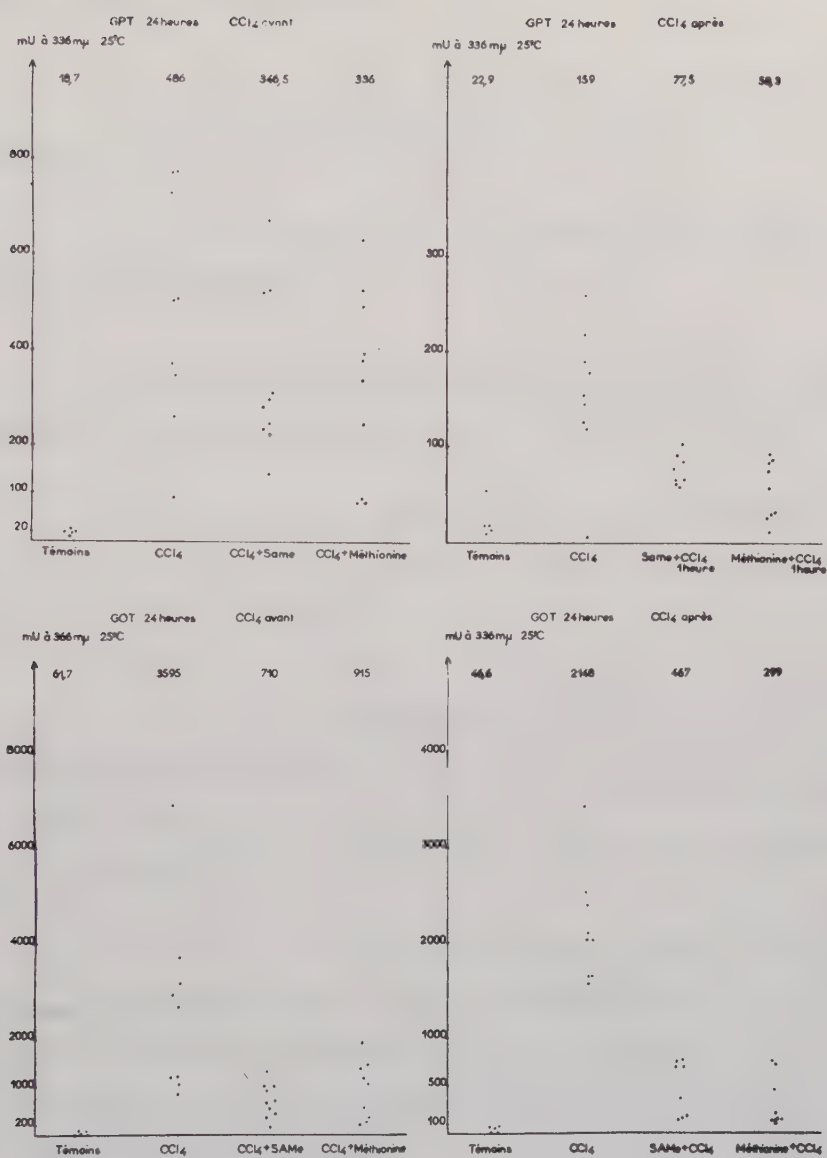


Figure 17

Comparaison des effets de l'administration de S-AME ou de méthionine 1 h avant ou après intoxication au tétrachlorure de carbone. Les activités GPT et GOT sont déterminées sur le plasma des animaux sacrifiés 24 h plus tard.

dans la protection contre l'intoxication de CCl_4 , en suivant les variations des activités transaminasiques.

Les substances ont été administrées par voie intrapéritonéale à des rats femelles.

- Le CCl_4 à la dose de 0,1 ml par rat, en dilution dans la même quantité d'huile de paraffine, pour le temps 24 h.

- La méthionine dans une solution de chlorure de sodium isotonique à raison de 12 mg/rat.

- La S-adenosylméthionine dans les mêmes conditions à la dose de 40 mg/rat. La solution est préparée extemporanément.

- les activités GPT et GOT sont déterminées selon le principe déjà décrit. Dans le cas de la GOT, la formation de l'acide oxalo-acétique est dosée par le système MDH-NADH.

L'expérience complète a été réalisée en deux étapes : chaque série comprenant des rats traités et des rats témoins. Un premier lot de rats a été traité par la méthionine ou la S-AMe 1 h avant l'administration de CCl_4 , un deuxième lot 1 h après. Les animaux ont été sacrifiés à la 24e heure.

Les effets de la S-AMe et de la méthionine sont semblables. Les moyennes des valeurs obtenues pour les rats ayant reçu à la fois le CCl_4 et la S-AMe ou la méthionine, par rapport à la moyenne de ceux traités uniquement par le CCl_4 , permettent de calculer le pourcentage d'efficacité de la méthionine et de la S-AMe.

Les calculs ont été effectués après déduction des valeurs moyennes des témoins.

	Méthionine avant	S-AMe avant	Méthionine après	S-AMe après
GPT	74 %	60 %	32 %	30 %
GOT	88 %	80 %	76 %	82 %

Une augmentation moins prononcée du taux de GOT est notée après administration de S-AMe ou de méthionine en solution de molarité équivalente, avant ou après l'administration de CCl_4 .

Pour les GPT, les résultats sont nets, si l'administration de CCl_4 a lieu après celle de méthionine ou de S-AMe. Or, l'évolution comparée dans le temps, de l'augmentation de ces 2 activités enzymatiques dans le sang, montre qu'elles sont absolument comparables. En conséquence, ce ne peut être une explication à nos résultats.

Par contre, cette différence dans la réponse des GPT ou GOT pourrait être due à un effet de protection de qualité différente vis à vis de structures touchant la GPT ou la GOT au temps de l'expérience c'est à dire vingt-quatre-heures.

La GOT est composée de deux iso-enzymes, l'une cytoplasmique, l'autre mitochondriale. Pour la GPT les différents auteurs ne sont pas d'accord. Certains la considère uniquement comme cytoplasmique NOTAR BARTOLO et Coll. (1966), d'autres à la fois cytoplasmique et mitochondriale (ZIMMERMAN et coll. 1965 - VILLA et col. 1966). Quoiqu'il en soit, on peut dire que la fraction mitochondriale est la plus importante pour la GOT (70 % : EICHEL, 1961), alors que pour la GPT la fraction cytoplasmique est la plus importante.

Il apparaît ainsi que l'administration de méthionine ou de S-AMe avant intoxication au CCl_4 est capable de protéger la cellule hépatique, mais que la protection assurée par la méthionine ou la S-AMe après intoxication au CCl_4 , ne peut s'effectuer que vis à vis de la fraction mitochondriale.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de mettre en évidence dans le sang, de rat, une activité MAE à la suite d'une cytolysé hépatique, et de montrer parallèlement la diminution de la MAE hépatique.

Par ailleurs, nous avons établi que par voie intra-péritonéale, les effets de la S-AMe et de la méthionine étaient semblables quant à la protection que ces substances pouvaient apporter contre une intoxication par le CCl_4 , et que suivant le moment de l'administration, l'efficacité était différente selon que l'on envisageait la GPT ou la GOT comme enzyme marqueur.

L'ÉTHIONINE

De très nombreux travaux ont prouvé que l'éthionine produit une grande variété d'effet, en particulier au niveau de la cellule hépatique. Nous citerons quelques résultats, qui bien que disparates nous ont fait choisir cette substance en raison de ses effets hépatotoxiques.

Comme nous l'avons déjà signalé, l'éthionine est l'analogue supérieure de la méthionine. Son administration provoque chez le rat une réponse métabolique au niveau du foie qui dépend du sexe. La femelle seule développe "un foie gras". FARBER et coll. en 1951, ont montré que cette différence est due, à la présence chez le mâle, d'androgène et que la protection des femelles pouvait ainsi, être assurée.

SHULL et coll. (1966) mettent en évidence une accumulation rapide de S-adénosyl-éthionine (S-AE) dans le foie. Un taux maximum se maintient pendant 24 h. Cette persistance s'explique par une concentration élevée d'éthionine libre dans le foie et le sang.

De plus, il est établi que l'éthionine induit une chute du taux d'ATP. Une concentration maximum de S-AE dans le foie est obtenue, par un taux d'éthionine, qui induit seulement une diminution modérée de la concentration en ATP. Mais, le taux d'ATP continue à chuter si la quantité d'éthionine administrée est augmentée au dessus de ce taux.

In vitro, l'éthionine se comporte comme un substrat de la MAE. Nous avons déjà vu que son efficacité relative en tant que substrat, par rapport à la méthionine, est plus faible et que d'autre part, la S-AE ainsi que la S-AMe sont de bons inhibiteurs de la MAE.

Nous avons étudié in vivo, l'effet de l'éthionine sur l'activité MAE et sur le taux de S-AMe.

1° Protocole

L'éthionine, en solution dans du chlorure de sodium isotonique est administrée par voie intra-péritonéale à raison de 250 mg/kg, 500 mg/Kg, 1 000 mg/kg, à des rats femelles pesant environ 200 g.

Les rats témoins reçoivent par la même voie, la solution de chlorure de sodium isotonique.

La solubilité du produit étant relativement faible, nous avons fait une solution à 50 mg/1,5 ml et nous avons considéré comme maximum le volume de 1,5 ml/rat, injecté par voie intra-péritonéale. C'est pourquoi nous avons donc effectué 4 injections à 1 h d'intervalle chacune, pour la plus haute dose (1 000 mg/kg).

2° Variations du taux de S-AMe et des activités enzymatiques

MAE - GPT - GOT en fonction de la dose

Les animaux sont sacrifiés 24 h après l'administration de la solution d'éthionine.

Les dosages effectués dans le foie montrent une diminution de l'activité enzymatique MAE et une élévation de la S-adénosylméthionine. En augmentant la dose d'éthionine, les phénomènes observés sont accentués.

	F O I E		P L A S M A		
	MAE*	S-AMe µg/g	GPT	GOT	MAE
TEMOINS	100	55	19,1	50,5	0
250 mg/kg	105,7	58	22,6	54,2	0
500 mg/kg	91,2	70	22,6	49,2	0
1000 mg/kg	66,4	78,5	24,7	45,1	0

* Les activités MAE calculées en $\mu\text{M/g}$ d'organe/30' ont été données par rapport à l'activité MAE des témoins dont la valeur a été ramenée à 100.

BALDESSARINI en 1966, a étudié les variations de la S-AMe après administration d'éthionine. Il ne constate pas de changement apparent pour une dose de 100 mg/kg aux temps 2 h et 18 h, mais par contre, une forte augmentation du taux de la S-AMe à la dose de 1 000 mg/kg.

Selon cet auteur, l'augmentation pourrait être due à la formation de S-adénosyl-éthionine qui interfère dans le dosage de la S-adénosine-méthionine.

La diminution de l'activité MAE pourrait s'expliquer par l'inhibition provoquée par la SAE formée.

Dans le plasma, nous n'avons pas noté de variations des activités transaminasiques, et nous n'avons pas trouvé d'activité MAE mesurable.

3° Variations de l'activité MAE en fonction du temps

- Une dose de 500 mg/kg a été administrée à des rats femelles. Les animaux (3 par temps) ont été sacrifiés après 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h.

L'activité MAE diminue les trois premiers jours et nous constatons au 7^e jour une activité MAE supérieure à la normale (Figure 18).

- Lorsque la dose utilisée est de 250 mg/kg, nous constatons une légère augmentation de l'activité MAE aux temps 30 mn et 24 heures.

	MAE
TEMOINS	100
250 mg/kg 30 '	110
250 mg/kg 24 h	106

Éthionine

Activité MAE en fonction du temps
pour une dose de 100mg (n: nombre de rats)

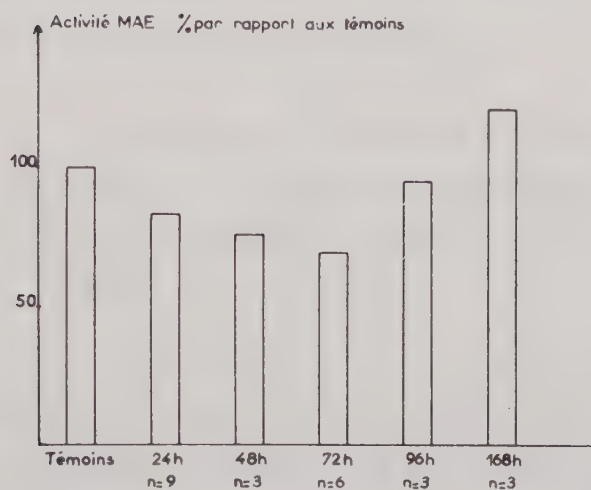


FIGURE 18

Variations de l'activité MAE en fonction du temps après administration de 500 mg/kg d'éthionine.

In vivo, il apparaît que l'éthionine semble bien jouer le rôle de substrat pour la MAE, pour une dose faible. Pour une dose plus importante, l'action inhibitrice de la S-adenosyl-éthionine est prépondérante et nous constatons une diminution de l'activité enzymatique.

Les résultats trouvés ont montré que pour une dose faible (250 mg/kg) ou une dose plus forte (500 mg/kg), mais après plusieurs jours, on mettait en évidence une faible augmentation de la MAE. Par contre, après 24 h, l'activité diminue avec l'augmentation de la dose.

Il nous fallait vérifier l'influence de la DL-éthionine, qui aurait pu être apporté par la préparation enzymatique, sur la mesure de l'activité MAE. Nous avons obtenu une inhibition de 4,8 % pour 1 µg, 9 % pour 10 µg, et 13,8 % pour 100 µg.

Il paraît peu probable que les déterminations effectuées avec des prises d'essais correspondant respectivement à 4 et 8 mg de foie, introduisent des quantités suffisantes de DL-éthionine.

Cependant, en dehors du problème de l'éthionine, se pose celui de la SAE formée qui a été décrit comme étant un bon inhibiteur de la MAE. Bien que nous y apportons quelques réserves, nous penchons plutôt pour l'hypothèse d'une activité MAE diminuée. On peut en effet penser que l'introduction de bases éthylées dans le RNA ou la formation de protéines anormales à partir de sRNA éthionine, conduisent à des anomalies, dans la formation de la MAE ou dans sa structure.

CONCLUSION

La figure 19 indique les principales étapes du métabolisme de l'éthionine.

Le mécanisme de l'effet de l'éthionine, sur le métabolisme protéique est toujours obscur. Il a été suggéré par LEVINE et TARVER 1951, que l'incorporation de l'éthionine dans les protéines du foie avec la production de protéines anormales peut jouer un rôle dans l'inhibition de la synthèse protéique.

Les changements biochimiques et structuraux dans le foie, induit par l'éthionine, offrent un intéressant exemple de lésions biochimiques induites par synthèse létale.

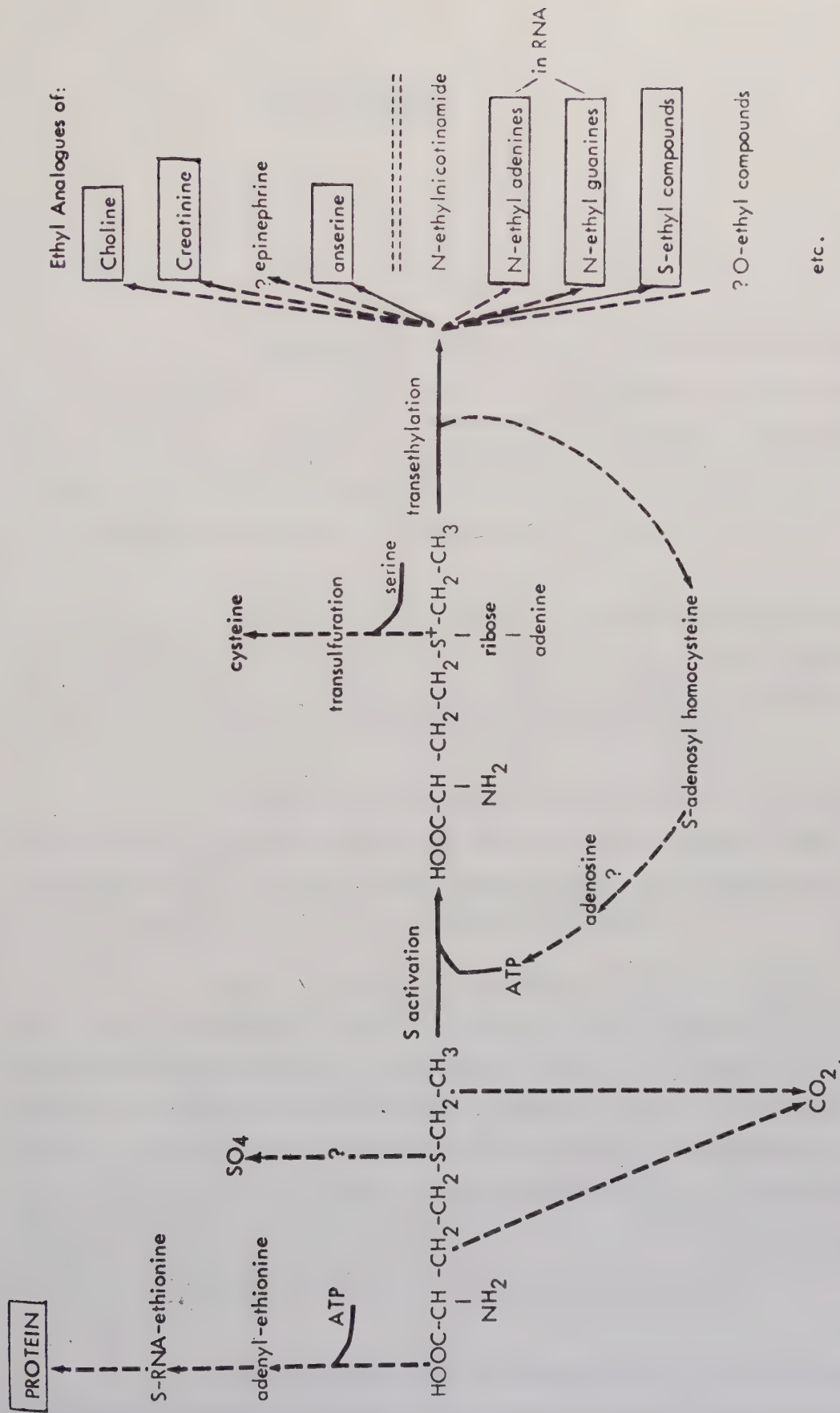


Figure 12 : METABOLISME DE L' ETHIONINE D'APRES FARRER E. (1963)

LE SELENIUM

L'importance du sélénium dans l'équilibre biologique animal, tend à faire classer cet élément parmi les oligoéléments indispensables. Mais, si, à faible dose, le sélénium a une action bénéfique, à doses élevées, ce métalloïde est très toxique et rappelle par certains aspects la toxicité de l'arsenic. Son rôle biochimique est encore obscur, mais se trouve probablement lié à sa ressemblance physique et chimique avec le soufre.

Au cours de l'intoxication, une partie du métalloïde s'élimine par les poumons sous forme de dérivés méthylés. Des études récentes, datant de 1966, effectuées avec du sélénium radio-actif (HIROOKA et GALAMBOS, Mc CONNELL et Coll.), ont confirmé la formation de diméthyl-sélénium.

In vivo, cette méthylation correspond à un processus de détoxification, qui a lieu au niveau du foie. In vitro, GANTHER (1966) a montré que le groupement méthyle de la S-adénosylméthionine est incorporé par les homogénats de foie de souris pour former le diméthyl-sélénium.

Mais par ailleurs, ROQUEBERT et Coll. (1963), SCHULTZ et LEWIS (1940), établissent que, la protection par la méthionine se montre beaucoup moins efficace que ne le laissaient prévoir les phénomènes de méthylation. SCALLA et WILLIAMS en 1962 décrivent l'inhibition de la croissance d'*Escherichia Coli* par le sélénite de sodium, et cette toxicité est augmentée par addition dans le milieu de L-méthionine. La méthionine réprime la biosynthèse de la séléno-méthionine qui pourrait être un produit de détoxification. En 1967, AHLUWALIA précise que cette croissance est inhibée si le sélénite de sodium est ajouté dans le milieu de culture à une concentration 10^{-4} M.

La biosynthèse de la séléno-méthionine est mal connue. Par contre son métabolisme est bien connu. MUDD et CANTONI (1958) ont montré sa transformation dans des conditions identiques à la méthionine en "séléno-méthionine active", c'est-à-dire en Se-adénosylsélénométhionine (Se-AME). BREMER et

NATORI (1960) ont étudié la Se-AMe en tant que donateur de méthyle dans la biosynthèse de la choline. Aussi, il est intéressant de connaître l'effet du sélénite de sodium au niveau de la formation de la S-adénosylméthionine et donc de l'enzyme activatrice de la méthionine.

I° ETUDE IN VIVO

a) Protocole

Le sélénite de sodium en solution dans du chlorure de sodium isotonique à la concentration de 1 mg/ml est administré par voie intrapéritonéale à la dose de 6 ml/kg à des rats Sprague-Dawley.

Les témoins reçoivent du chlorure de sodium isotonique à raison de 6 ml/kg.

Les animaux sont sacrifiés par décapitation dans les deux premières expériences. Dans la 3e expérimentation les animaux sont anesthésiés à l'éther, afin de prélever d'abord le sang par ponction aortique.

b) Variations de l'activité MAE dans le foie

- Evolution de l'effet en 48 h sur des rats mâles

L'étude porte sur des rats mâles de 200 à 250 g. Après administration de la solution de sélénite de sodium, les animaux sont sacrifiés aux temps 30' - 1 h - 4 h - 24 h - 48 h -

Pour chaque temps, nous avons utilisé 6 rats traités et 6 rats témoins. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant.

Temps	μM de S-AMe formée/ mg de protéine/30'/37°	μM de S-AMe formée/ g de tissus frais/30'/37°
30'	66,5*	67,5
1 h	65,7	92
4 h	102	84,5
24 h	98,5	78
48 h	78,5	80

* Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins correspondants. Ce sont les pourcentages des moyennes des valeurs obtenues sur 12 rats (6 témoins + 6 traités).

L'inhibition est maximum et concordante dans les deux modes d'expression en 30 minutes.

- Effet en 30 mn sur des rats femelles -

Les animaux sont sacrifiés 30 mn après l'administration de la solution de sélénite de sodium.

	μM/mg de protéines	μM/g de tissus	μM/organe
Témoins	1,96	217	1 682
Traités	1,45*	202	1 553

* Les résultats exprimés en μM/mg de protéines sont significatifs à $P = 0,05$ la valeur trouvée par rapport aux témoins est égale à 76,6 %.

Cette expérimentation indique une inhibition de l'activité

enzymatique MAE in vivo sur les rats mâles et femelles.

c) Variations des activités MAE, GPT, OCT dans le plasma

Cette expérimentation nécessite 24 rats :
12 témoins et 12 traités, qui sont sacrifiés au bout de 30' - 1 h - 48 h -
(4 rats par temps).

Nous n'avons pas trouvé d'activité MAE mesurable dans le plasma. Au temps 48 h, on observe une augmentation de l'OCT sur les 2 rats restants (2 morts sur les 4 traités).

2° ETUDE IN VITRO

L'effet du sélénite de sodium a été étudié in vitro sur une préparation de foie de lapin partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium. Cette inhibition est de 94 % pour une concentration 10^{-3} M, de 74 % pour une concentration 10^{-4} M. Le sélénite de sodium n'a pas d'effet pour une concentration 10^{-5} M.

Les résultats obtenus montrent que le sélénite de sodium est inhibiteur de la MAE in vitro comme in vivo.

3° DISCUSSION

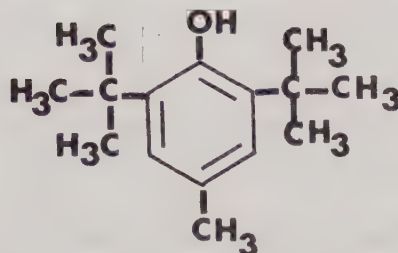
Si l'on veut envisager le mécanisme de la toxicité du sélénium, en se référant aux différents travaux réalisés, on constate que deux possibilités d'action nocive peuvent être envisagées.

Tout d'abord, le sélénium peut remplacer le soufre dans les acides aminés cystine et méthionine. En effet, l'isolement du glutathion contenant du Se à partir de sang de boeuf intoxiqué a été décrit.

De plus, il est connu que le sélénium peut agir directement sur certains systèmes enzymatiques, et l'inhibition de la succino-deshydrogénase a pu être observé in vitro comme in vivo chez le rat.

Le sélénium pourrait bloquer les groupes sulfhydryles nécessaires à l'activité de cette enzyme.

B. H. T.



Le di-tertio-butyl-hydroxy-toluène est un antioxygène utilisé comme additif alimentaire.

L'administration du B.H.T. détermine une incontestable hépatomégalie.

Il a été démontré chez le rat, une aptitude accrue du foie, à métaboliser le B.H.T. qui permet à l'organisme de s'adapter à l'invasion de surcharges massives de cet additif. Ce processus adaptatif de défense explique que l'organisme du rat, puisse tolérer plusieurs centaines de mg/j/kg de B.H.T., sans montrer de symptômes nets d'intoxication.

Cette adaptation à de fortes doses de B.H.T. permet également de comprendre, comment après une période préliminaire de 24 h à 48 H, l'hypertrophie du foie ainsi que la variation d'activité de différentes enzymes, se stabilise à un palier qui demeure constant pendant toute la durée du traitement.

1° ADMINISTRATION UNIQUE

Le B.H.T. en solution dans de l'huile d'olive, est administré à la dose de 500 mg/kg, par sonde oesophagienne, à des rats femelles Sprague-Dawley de 150 à 200 g.

Les animaux sont sacrifiés par décapitation aux temps 30' - 1 h - 4 h, après l'administration du B.H.T.

L'activité MAE, dosée dans les foies est plus faible pour les temps 30' et 1 h, elle est normale à la 4e heure.

Pour les mêmes temps, l'augmentation de la S-AME relative par rapport aux témoins, semble due à la valeur basse de ceux-ci. Ce résultat, difficilement interprétable pourrait donc bien être dénué de signification.

	M A E ^(a)		S - A M E	
	mμM/g de tissus	mμM/mg de protéine	μg/g	μg/organe
Témoin	434 ^(b)	3,49	20	100
30'	231	2,89	34	170
1 h	245	2,97	52,5	260
4 h	424	3,85	40	200

(a) exprimée en mμM de S-AME formée dans les conditions de l'expérience soit par gramme de tissu, soit par mg de protéine.

(b) chaque résultat représente la moyenne de 2 dosages effectués sur un pool de 3 extraits préparés à partir de 3 foies de rats.

En cherchant à interpréter ces résultats, nous avons :

1° Etudié l'action du B.H.T. in vitro

Nous avons utilisé dans le milieu d'incubation des concentrations allant de 10^{-6} à 10^{-3} M. En aucun cas, nous n'avons noté des modifications de l'activité de la MAE.

2° Recherché une activité MAE dans le sang

Les résultats ont toujours été non significatifs.

3° Nous avons prolongé l'administration.

2° ADMINISTRATION REPETEE

La solution de B.H.T. est administrée à la dose de 500 mg/j/kg pendant 5 jours, interruption pendant 48 h, puis reprise pendant 3 jours. Chaque jour 3 rats sont sacrifiés.

Les résultats sont représentés par les Tableaux 5 et 6. Aucune variation significative de la S-AMe n'a été mise en évidence. L'activité MAE se maintient à 50 % par rapport à la normale. (Figure 20).

Il apparaît difficile de trouver une explication simple à cet effet. Il a été montré que le B.H.T. induit des variations d'activité de différentes enzymes (PASCAL et coll. 1969) mais le mécanisme de ces diverses influences n'a pas été élucidé.

Enzymes microsomiales

- induction d'une stimulation des enzymes microsomiales métabolisant les drogues étrangères à l'organisme : hexobarbitone oxydase, amidopyrine déméthylase, déméthylase du nitroanisol.
- diminution de l'activité de la glucose-6-phosphatase.

Enzyme lysosomiale

- diminution de l'activité de la phosphatase acide.

Enzyme mitochondriale

- diminution de l'activité de la cytochrome oxydase

Enzyme cytoplasmique

- augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

	µg/g de tissus	µg/organe
Témoins	47) 42) 49,6 50)	360) 317) 351 378)
Qté totale de BHT administrée	30)	187)
T après la lère administration	50) 43	334) 271
à raison de 500 mg/j/kg	50)	293)
1000 mg/kg 48 h	31) 45) 49,3 72)	272) 315) 365 510)
1500 mg/kg 72 h	60) 52) 50,6 40)	586) 475) 510 470)
2000 mg/kg 96 h	51) 37) 38,3 27)	478) 320) 358 276)
2000 mg/kg 168 h	30) 30) 28,3 25)	348) 372) 334 283)
2500 mg/kg 216 h	40) 58) 51,3 56)	567) 651) 593 563)

M A E D A N S L E F O I E

	mpM/g de tissus	mpM/mg de protéines	mpM/organe
Témoins	518) 403) 472)	3,77) 3,16) 2,84)	3975) 3052) 3584)
Quantité tot.deBHT adm.	343)	2,98)	2131)
24 h	305) 295)	3,39) 3,11)	2045) 1717)
1000 mg/kg	232)	2,44)	2053)
48 h	168) 188)	2,10) 1,93)	1186) 1340)
1500 mg/kg	271)	1,96)	2653)
72 h	246) 178)	1,67) 1,26)	2254) 2004)
2000 mg/kg	225)	1,60)	2586)
96 h	185) 222)	1,40) 1,40)	1596) 2274)
2000 mg/kg	137)	1,27)	1595)
168 h	159) 169)	1,93) 1,38)	1994) 1916)
2500 mg/kg	184)	2,04)	2614)
216 h	202) 208)	2,79) 2,31)	2275) 2100)
	198)	2,38)	2329)

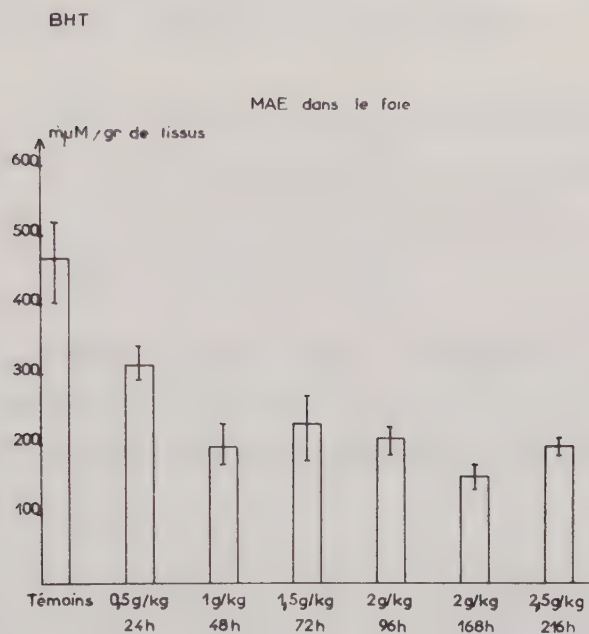


FIGURE 20

Activité MAE dans le foie.

L'activité est exprimée en mpM de S-AMe formée/g de tissus frais
 Nous avons représenté les moyennes des valeurs obtenues accompagnées de l'écart trouvé entre les valeurs les plus faibles et les plus fortes.

3° DISCUSSION

Les résultats ne peuvent avoir de signification si l'inappétence des animaux est la cause de variations importantes de l'activité MAE.

PAN et TARVER (1967)^a ont étudié l'influence de 4 jours de jeûne. Ils ont noté une diminution de la MAE les 2 premiers jours, suivie d'une remontée rapide. Au 4e jour l'activité est nettement supérieure, à la normale (résultats exprimés en $\mu\text{M/g}$ de foie).

PASCAL et coll. 1969, déterminent qu'au cours d'une administration prolongée de B.H.T. on peut noter une chute de l'ingestion alimentaire pendant les 3e jours, puis une remontée rapide de la quantité d'aliments consommée.

Cette variation dans la quantité de nourriture ingérée n'explique pas totalement la chute de la MAE. Et, c'est pourquoi nous avons poursuivi l'administration durant neuf jours.

L'influence du B.H.T. sur l'activité MAE semble être une caractéristique de cet antioxygène. Son mécanisme d'action reste inexpliqué.

Une autre substance ayant la même propriété antioxygène : le gallate de propyle, administré à la dose de : 66 mg/kg par voie intra-péritonéale, n'a provoqué aucune variation du taux de S-AMe, ni de l'activité MAE.

L'expérimentation a été effectuée sur des rats femelles. Les animaux ont été sacrifiés après 30', 1 h, 4 h, après une injection. Pour la seconde étude, les animaux ont reçu 66 mg/j/kg, pendant 3 jours. Ils ont été sacrifiés 72 h après la dernière injection.

Le sélénium, étudié dans le chapitre précédent est également un antioxygène. Il serait intéressant d'étudier d'autres antioxygènes, en particulier le butyl-hydroxy-anisol et les tocophérols.

V - CONCLUSION

Au cours des différentes expérimentations entreprises, nous avons noté des variations très précoces, rapidement compensées.

Si l'on prend l'exemple de l'éthionine, l'effet évident, mais discret, que nous avons mis en évidence, ne semble pas en rapport avec l'importance et les conséquences de la formation de la S-adénosyléthionine. Un problème fondamental soulevé ces dernières années est celui des méthylases des sRNA en rapport avec la croissance tumorale.

Il semble d'une part que l'on ait pu retrouver une quantité plus élevée de bases méthylées dans les sRNA de tissus tumoraux et d'autre part que ces méthylases sont capables d'utiliser la S-adénosyléthionine en lieu et place de la S-adénosylméthionine, en donnant des bases éthylées (CRADDOCK 1970). Or ces produits anormaux seraient par la suite introduits dans les protéines.

Il semble donc que, sur le plan quantitatif les résultats observés ne soient pas en rapport avec les perturbations provoquées, mais que la mise en évidence de variations quantitativement faibles, doit être suffisante pour faire présager des effets importants.

CHAPITRE III

VARIATIONS PHYSIO-PATHOLOGIQUES DE LA S-AMe ET DE LA MAE

VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Malgré l'importance de la S-adénosylméthionine et de la méthionine adénosyltransférase dans les réactions métaboliques, les connaissances concernant les facteurs qui régissent ce système enzymatique sont encore très fragmentaires.

Parmi les travaux réalisés, nous avons retenu d'une part l'influence des facteurs hormonaux et nutritionnels sur l'activité MAE, et d'autre part l'action des inhibiteurs de la catéchol-O-méthyltransférase sur les taux de S-adénosylméthionine.

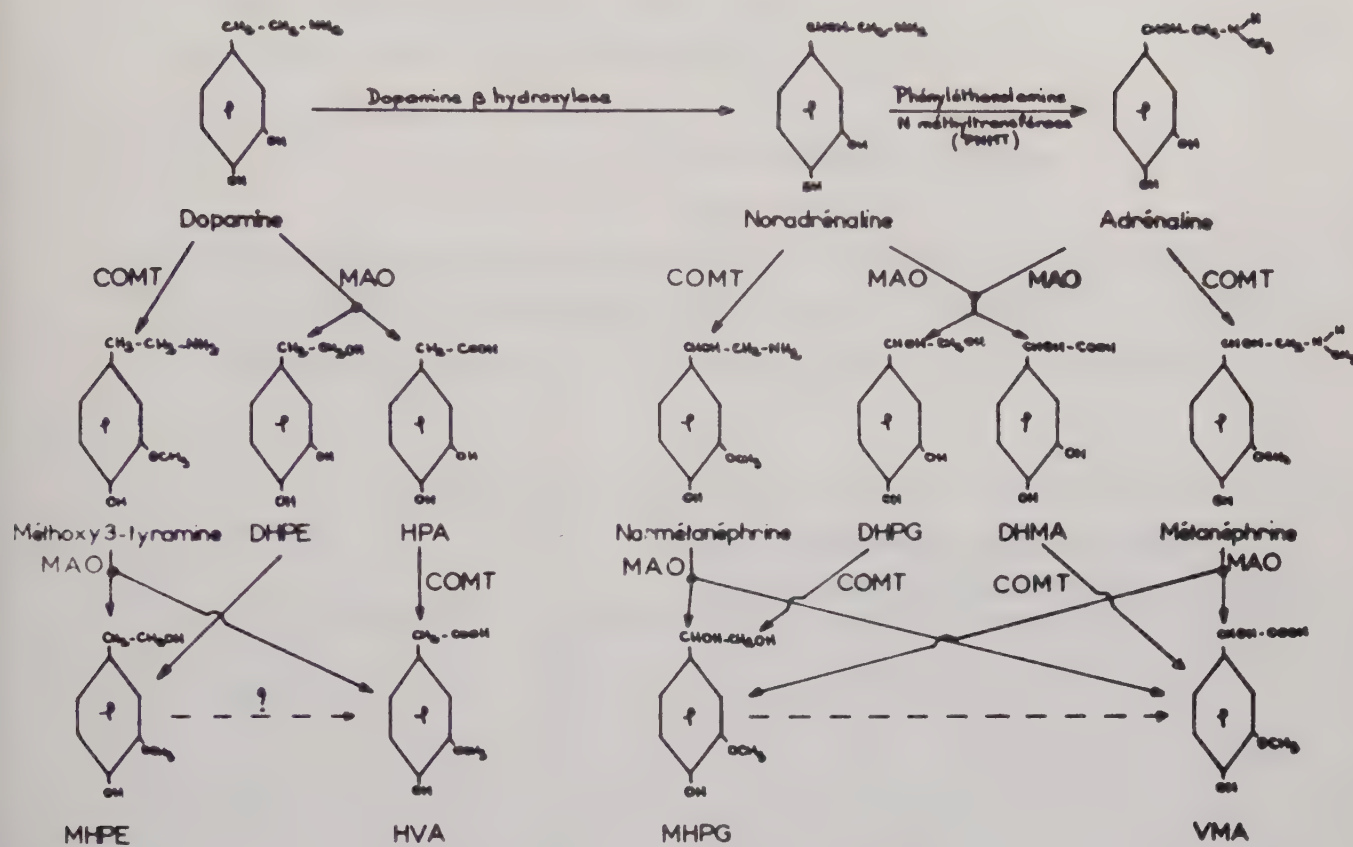
L'utilisation de ces inhibiteurs est logique car si nous prenons l'exemple du catabolisme des catécholamines dont les diverses voies possibles d'inactivation enzymatique sont résumées dans la figure 21, nous constatons la nécessité de la présence de la S-adénosylméthionine, qui est le donneur de méthyle.

De plus, cette remarque a été le point de départ de l'étude que nous avons faite des 3 types de tissus tumoraux. En effet, il est connu que l'on trouve de grandes quantités d'acide vanillylmandélique (VMA) et d'acide homovanillique (HVA) dans l'urine de malades atteints de neuroblastomes. (BOHUON 1965)

L'excrétion de ces composés O-méthylés peuvent atteindre cent milligrammes par jour. Pour la biosynthèse de ces composés méthylés directement dérivés des catécholamines, il est toujours nécessaire que le groupement méthyle soit introduit en position 3 (ou 4) par la catéchol-O-méthyltransférase, le cofacteur de cette réaction enzymatique étant la S-adénosylméthionine.

Dans la 1ère partie de ce chapitre, nous rapportons brièvement les variations physiopathologiques de la S-AMe et de MAE décrites chez l'animal.

La 2e partie est consacrée d'une part aux taux de S-AMe que nous avons déterminé dans le sang total d'enfants cancéreux et normaux ainsi que chez l'adulte, d'autre part aux résultats de l'étude que nous avons faite de 3 tissus humains pathologiques, neuroblastome, phéochromocytome et ganglioneurome.



CATABOLISME DES CATECHOLAMINES

Figure 21-

- COMT = catéchol-O-méthyltransférase
 MAO = monoamine oxydase
 DHPE = dihydroxy-phényléthanol
 HPA = acide dihydroxy-phénylacétique
 DHPG = dihydroxy-phénylglycol
 DHMA = acide dihydroxy-phénylacétique
 MHPE = méthoxy-hydroxy-phényléthanol
 HVA = acide homovanillique
 MHPG = méthoxy-hydroxy-phénylglycol
 VMA = acide vanillyl-mandélique

I. ETUDE SUR L'ANIMAL

1° Variations physiologiques

Nous envisageons les variations qui ont été mises en évidence en fonction de l'espèce dans un même organe, puis les différents taux obtenus chez le rat en fonction de l'organe, de l'âge et du sexe.

a) En fonction de l'espèce

MUDD et coll. en 1965, ont étudié les activités MAE dans le foie de divers mammifères. Les foies de lapin, de singe et de rat, ont des activités équivalentes alors que pour le foie de porc, de boeuf et de l'homme, des activités 4 à 5 fois plus faibles ont été obtenues.

Espèces	MAE (selon MUDD et coll. en 1965) mμM de S-AMe formée/mg de protéines/60 mn
Lapin	37
Singe	37
Rat	34
Homme	9,7
Boeuf	8,4
Porc	5,7

b) En fonction de l'organe

Les études effectuées sur le rat ont établi que chez cet animal, l'activité MAE est nettement plus élevée dans le foie que dans les autres tissus, mais que par contre les taux de S-AMe sont plus homogènes, les surrénales étant les plus riches (résultats exprimés par μg de S-AMe par gramme de tissus).

Tissus	MAE $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines/60 mn (MUTT et coll. 1965)	S-AMe $\mu\text{g}/\text{g}$ (BALDESSARINI 1966)
Foie	34	$26,0 \pm 1,0$
Pancréas	8	$20,4 \pm 5,4$
Rein	9,9	$20,4 \pm 5,4$
Tissus adipeux	1,5	—
Cerveau	3,3	$11,5 \pm 0,5$
Muqueuse de l'intestin grêle	2,2	—
Rate	2,4	$20,4 \pm 4,2$
Surrénale	4,2	$48,0 \pm 10,0$
Poumons	1,7	$11,1 \pm 2,2$
Testicules	3,3	—
Coeur	1,0	$25,7 \pm 6,2$
Muscle	0,34 (1,25)	—

c) En fonction de l'âge

Les variations des activités spécifiques MAE au cours de la vie foetale et durant les jours suivant la naissance ont été déterminées par CHASE et Coll. en 1968.

Dans le cerveau et le rein, l'activité spécifique ne change pas de façon marquante du stade foetale à la vie adulte, alors que dans le foie, elle commence à augmenter à la fin de la vie foetale et atteint un maximum deux jours après la naissance.

Dans le petit intestin, c'est à l'âge de deux semaines seulement que l'activité spécifique commence à s'élever pour atteindre son maximum trois jours plus tard.

Ces résultats sont complétés par ceux antérieurs de FINKELSTEIN 1967, déterminant les activités MAE dans le foie, le rein, le pancréas et le cerveau, de la naissance à l'âge adulte. Les valeurs ainsi déterminées sont résumées dans le tableau suivant, qui montre la diminution de l'activité MAE hépatique en fonction de l'âge.

Poids gr. (a)	Foie	Rein	Pancréas	Cerveau
6	56 ^(b)	9,1	-	4,0
70	52	10,4	5,9	3,8
140	42	10,4	7,1	3,8
280	34	7,1	7,9	3,4

(a) rats mâles Sprague Dawley à l'exception de ceux de 6 gr.

(b) MAE en mpm/mg de protéines/60 minutes.

d) En fonction du sexe

Après avoir constaté que l'activité MAE hépatique chez la ratte adulte est plus importante que chez le rat mâle (NATORI 1963), différents auteurs ont mis en évidence l'importance des hormones sexuelles.

D'une part, la castration des mâles provoque une augmentation de l'activité MAE, qui revient à sa valeur normale par administration de 17 alpha éthyl-19 nortestérone.

D'autre part, l'ovariectomie diminue l'activité MAE, tandis que l'administration de 17 β oestradiol ou de diéthylstilboestrol, renverse cet effet. La progestérone n'a pas d'action. De plus, l'oestradiol administré à des rats mâles augmente leur activité MAE hépatique au niveau de celui des femelles (PAN et Coll. 1968)^a.

2° Influence des facteurs nutritionnels

Ces facteurs ont été étudiés par différents auteurs et particulièrement par PAN et TARVER (1967)⁶. Nous retiendrons les teneurs en protéine du régime, la méthionine et l'effet du jeûne.

a) Teneurs en protéine du régime

L'activité varie avec la teneur en protéine du régime. Des animaux nourris avec un régime riche en protéine ont une activité MAE plus importante.

Cependant, il faut signaler que les animaux surrénalectomisés ou hypophysectomisés ont de faibles activités quelle que soit la teneur en protéine de leur régime.

b) Méthionine

Un excès de méthionine ajouté à un régime à 27 % de caséine provoque de faibles changements de l'activité MAE. Par contre, une injection intra-péritonéale de L-méthionine provoque une augmentation importante et rapide du taux de S-Ame dans les tissus (BALDESSARINI 1966). L'effet toxique de la méthionine à forte dose a été décrit. Cette toxicité doit être rapportée à une surconsommation de l'ATP, nécessaire pour la synthèse de la S-Ame.

c) Effet du jeûne

Un jeûne de 2 jours provoque une diminution d'activité qui retourne à la normale dans les deux jours suivants (FINKELSTEIN 1967).

3° Influence des facteurs hormonaux

Nous avons décrit précédemment l'importance des hormones sexuelles, sur lesquelles nous ne reviendrons pas.

Parmi les autres facteurs, pouvant intervenir, nous citerons : la triamcinolone, qui parmi les glucocorticoïdes est le plus puissant inducteur d'activité MAE ; la thyroxine qui diminue l'activité MAE.

L'action des hormones pancréatiques est moins bien définie. Si le glucagon, hormone hyperglycémisante a un effet faible, l'insuline, dont l'action physiologique est antagoniste, provoque une faible augmentation de la MAE et d'autre part l'administration d'insuline peut prévenir ou renverser l'augmentation MAE provoquée par l'alloxane.

4° Variations pathologiques

Ce sont les hépatomes de foie de souris qui ont été étudiées par HANCOCK 1966. Ces travaux ont montré qu'il n'y avait pas dans ces tissus cancéreux d'activité MAE mesurable....., et l'hypothèse émise est que, des traces de cette enzyme sont suffisantes pour la méthylation du sRNA.

Par ailleurs, l'hépatome B.W. 7756 de souris possède une plus faible activité de méthylation que le foie de souris normal, si la L-méthionine $^{14}\text{CH}_3$ est utilisé comme donateur de méthyle. Cependant, l'hépatome a 2 fois plus d'activité sRNA méthylase que le tissu hépatique normal correspondant. Ces résultats sont trop faibles et contradictoires pour que des conclusions puissent en être déduites.

II. PATHOLOGIE HUMAINE

Nous avons signalé dans l'introduction de ce chapitre l'intérêt que pouvait représenter l'étude des neuroblastomes. En effet, l'étude biochimique de tumeurs nées d'ébauches sympathiques, s'est révélée très fructueuse. Les neuroblastomes offrent, aux biochimistes intéressés par les problèmes de cancérologie, un matériel intéressant pour les études sur la biochimie de la cellule maligne.

Cette tumeur n'est pas très rare, elle vient par ordre de fréquence après les leucoses et les néphroblastomes. Le tissu tumoral obtenu chirurgicalement est homogène mais souvent fort nécrosé, ce qui peut rendre délicat l'interprétation des résultats.

Parmi les recherches qui se poursuivent dans plusieurs directions, figurent celles de GJESSING 1963. Ce chercheur a pu mettre en évidence dans les urines d'enfants porteurs de neuroblastomes avec métastases une grande quantité de cystathionine (200 à 900 microgrammes par milligramme de créatinine). Dans les ganglioneuromes bénins, il a trouvé des valeurs de l'ordre de 5 à 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de créatinine. Dans les tumeurs elles-mêmes GJESSING trouva des taux de 6 à 8 mg/g de tissu tumoral, alors que le foie, les surrénales, la thyroïde ne renferment la cystathionine qu'à des concentrations inférieures à 1 mg/g .

La 1ère hypothèse était que l'accumulation de la cystathionine dans le tissu tumoral apparaissait d'une part comme le résultat d'un accroissement du métabolisme de la méthionine provoqué lui-même par l'accroissement des réactions de méthylation, et d'autre part comme un résultat de l'inhibition de la cystathionine dû à un déficit en vitamine B6.

La 2e hypothèse est que la cystathionine est provoquée par la lyse tumorale. Si la masse totale des métastases est grande la cystathionine sera prononcée.

C'est ainsi que nous avons été amené à étudier le taux de S-AMe dans le sang d'enfants cancéreux ainsi que l'activité méthionine-S-adénosyltransférase et le taux de S-AMe dans 3 types de tissus tumoraux.

1° Taux de S-AMe dans le sang

Les dosages sont effectués sur le sang total. Le sang est recueilli sur héparine sèche (1 $\text{mg}/10 \text{ ml}$) après ponction veineuse.

La S-AMe est extraite de la même façon que pour les tissus. Nous utilisons 5 ml d'acide trichloracétique à 10 % pour 1 ml de sang.

Les résultats obtenus montrent clairement que les valeurs de S-AMe dans le sang sont semblables dans les différents groupes d'enfants étudiés, mais on note une différence significative entre adultes et enfants. (Tableau 7).

TABLEAU 7

TAUX DE S-AMe DANS LE SANG TOTAL

	S - A M e
Neuroblastome (16)*	5,90 $\mu\text{g/ml}$ $\pm$ 2,40
Tumeurs autres que neuroblastomes (12)	7,98 $\mu\text{g/ml}$ $\pm$ 1,24
Leucémie (12)	4,59 $\mu\text{g/ml}$ $\pm$ 1,06
Enfants normaux (17)	5,75 $\mu\text{g/ml}$ $\pm$ 0,75
Adultes normaux (21)	0,80 $\mu\text{g/ml}$ $\pm$ 0,15

* Nombre de patients

Chaque moyenne est assortie de ses limites de
confiance à $P = 0,05$

2° Leucémie

Dans le sang total d'enfants leucémiques, nous avons trouvé un taux de S-AMe moyen de $4,59 \mu\text{g/ml} \pm 1,06$. Il n'existe aucune différence significative entre le taux de S-AMe du sang total d'enfants normaux et d'enfants leucémiques. Par contre, BALDESSARINI (1965-1966) met en évidence dans les leucocytes de malades atteints de leucémie myéloïde chronique, une augmentation du taux de S-AMe :

Leucocytes de malades : $8,6 \mu\text{g/g} \pm 1,6 \mu\text{g/g}$

Leucocytes de témoins : $2,0 \mu\text{g/g}$ de tissus frais.

Cette augmentation coïncide avec l'augmentation en vitamine B12 et en acide folique.

Ce même auteur ne trouve pas de variations significatives du taux de MAE.

3° Tumeurs

Les déterminations ont été effectuées sur 3 types de tumeurs : ganglioneurome, neuroblastome, phéochromocytome.

Les dosages de S-AMe et les mesures des activités MAE ont été effectués par les méthodes précédemment décrites.

Les résultats sont donnés dans le tableau 8 .

Les difficultés de ces dosages sont dues non seulement à la rapidité nécessaire de l'exécution après prélèvement de la pièce anatomique, mais encore à la difficulté de trouver un mode convenable d'expression des résultats.

Ces tissus d'une part sont hétérogènes et bien souvent nécrosés, aussi il serait souhaitable d'exprimer le taux de S-AMe par mg de DNA.

	S - A M e µg/g	M A E mmM/mg de protéines	mmM/g de tissus
<u>GANGLIONEUROME</u>			
L - Q 26 ans (abdominal)	Grosse tumeur 3 fractions : - 36 - 24 - 28 moyenne = 29	-	-
B - Q 23 ans + (thoracique)	147	0,095	7,8
<u>NEUROBLASTOME</u>			
H - Q 6 ans + (abdominal)	-	0,23	11,9
T - Q 3 ans + (thoracique)	21	0,26	14,47
G - Q 3 ans + (thoracique)	18,6	0,041	3,5
D - 11 mois	0	-	-
<u>PHEOCHROMOCYTOME</u>			
R -	19	0,17	17

III. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats des études des variations physiologiques chez l'animal ont montré l'importance des notions d'espèce, d'âge et de sexe, ainsi que l'influence des facteurs hormonaux et nutritionnels. Ces données sont essentielles pour la conduite correcte d'une expérimentation in vivo.

Les études des neuroblastomes et autres tissus tumoraux voisins, nous ont permis de mettre en évidence une activité MAE et la présence de S-AMe dans tous les cas étudiés sauf un.

L'activité MAE est assez faible, mais est certainement largement suffisante pour assurer la biosynthèse de la S-AMe nécessaire pour inactiver les catécholamines au sein de la tumeur.

Il faut donc admettre que le renouvellement de la S-AMe est très intense, ce qui expliquerait les résultats obtenus par D'ANGIO (1969) dans la fixation de la 75 sélénométhionine par les neuroblastomes.

C O N C L U S I O N

Dans ce travail, nous nous sommes proposé d'apporter une contribution à l'étude du rôle de la S-adénosylméthionine et de la méthionine adénosyltransférase, en cherchant à établir qu'elles étaient les variations du taux de S-AMe et de l'activité MAE, sous l'influence de perturbations métaboliques, réalisées expérimentalement par des substances administrées à doses toxiques à des rats ou à des lapins, ou apparaissant chez des malades porteurs de tumeurs malignes (neuroblastomes).

Nous avons consacré une première partie de ce travail à une mise au point des techniques de dosages de la S-AMe et de l'enzyme synthétisant cet important cofacteur de méthylation. En effet, peu de travaux analytiques ont été publiés. Les variations du système enzymatique S-AMe-MAE, étant le but essentiel de cette thèse, il était donc nécessaire d'étudier de façon détaillée cet aspect méthodologique.

Nous avons également tenté de purifier la MAE en vue d'étudier ses constantes physico-chimiques et dans le but essentiel d'obtenir ultérieurement des anticorps. Nous avons obtenu l'enzyme à un degré de pureté d'environ 100 fois, mais jamais plus en raison de sa grande labilité et de l'inefficacité des différents produits expérimentés pour la stabiliser et obtenir des conditions satisfaisantes de conservation. Le dithiothreitol, le mercaptoéthanol, l'acide éthylène tétracétique se sont montrés inactifs et l'action protectrice du glutathion est insuffisante.

La deuxième partie a été consacrée à l'étude de l'influence de substances à tropisme hépatique, administrées à doses toxiques. Les protocoles expérimentaux ont été établis en tenant compte des difficultés inhérentes au dosage. Une période de temps aussi réduite que possible devant s'écouler entre le sacrifice de l'animal intoxiqué et la détermination de l'activité enzymatique.

Le Tétrachlorure de carbone, nous a permis de mettre en évidence une activité enzymatique MAE à la suite d'une lyse cellulaire dans les plasma des rats intoxiqués, avec parallèlement la diminution de l'activité MAE dans le foie.

En outre, nous avons comparé les effets protecteurs de la S-AMe et de la méthionine, administrées par voie intra-péritonéale, qui se sont montrés équivalents vis à vis de l'effet cytolytique apprécié d'après l'augmentation dans le plasma des transaminases glutamique pyruvique et oxalo-acétique.

Lorsque l'administration de l'une ou l'autre de ces substances a lieu après celle de tétrachlorure de carbone, leur efficacité est nette uniquement vis à vis de la transaminase glutamique oxalo-acétique. Cette action peut s'expliquer par une localisation intra-cellulaire qualitative et/ou quantitative différente.

L'étude in vivo de l'éthionine administrée aux doses de 250, 500, 1 000 mg/kg montre la variation de la réponse en fonction de la dose et du temps considérés, entre l'injection et le sacrifice. Elle paraît être la composante de différents facteurs qui peuvent être mis en cause. Ce sont en particulier, les quantités présentes d'éthionine et de S-adénosyléthionine formée, les actions et les transformations respectives de ces deux substances.

Nous avons montré que pour un temps court (trente minutes), ou pour la plus faible dose, on obtenait une légère augmentation de l'activité MAE, et pour un temps plus long, ou une dose forte, une diminution de cette activité. Ces deux phénomènes sont en rapport très net avec les différentes fonctions que l'on peut attribuer à l'éthionine et à la S-adénosyléthionine. La formation de S-adénosyléthionine à partir de l'éthionine provoque une consommation d'adénosine triphosphate (ATP), et on assiste à une diminution progressive de la concentration en ATP. De même, l'effet toxique de la méthionine administrée à haute dose serait dû, au moins en partie, à une diminution du taux d'ATP.

Le sélénite de sodium, administré à la dose de 6 mg/kg se montre inhibiteur de la MAE. In vitro, il provoque une inhibition de 74 % à la concentration 1.10^{-4} Molaire. De même avec le ditertio-butyl-hydroxy-toluène (B.H.T.) provoquant aux doses de 500 mg/kg/jour, une hépatomégalie très rapide et très nette, nous avons mis en évidence une diminution de l'activité MAE.

Ces deux substances ont des propriétés antioxygènes. Il serait sans doute souhaitable de poursuivre cette expérimentation avec d'autres antioxygènes tels les tocophérols, et le butyl-hydroxy-anisol. On peut cependant penser que même à des doses toxiques, la quantité de S-AMe formée est toujours suffisante pour permettre aux différentes réactions de trans-méthylation de s'effectuer sinon normalement, du moins avec une intensité suffisante pour ne pas provoquer de troubles sévères chez les animaux intoxiqués.

La troisième partie est consacrée à l'étude de tissus humains tumoraux et plus particulièrement aux neuroblastomes, en raison des processus importants de méthylation mis en évidence par la présence de composés méthylés en quantités importantes dans l'urine.

Cependant, bien que nous ayons trouvé une activité MAE dans les tumeurs étudiées, celle-ci est faible, de même pour les taux de S-AMe (sauf dans le ganglioneurome).

Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs sur les hépatomes, et confirment qu'une petite activité MAE est capable d'assurer un taux de S-AMe suffisant, et que cette enzyme soit n'est pas saturée, soit possède un turn-over important. C'est pourquoi, il serait sans doute fort utile de pouvoir déterminer le turn-over de la S-AMe dans les différents tissus plutôt que son taux.

Les dosages de S-AMe effectués parallèlement dans le sang d'enfants et d'adultes, ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les enfants porteurs de tumeurs diverses et les témoins, mais que par contre, il était possible de noter une différence entre les adultes et les enfants.

Par ailleurs, il aurait été intéressant de déterminer chez ces enfants, le taux d'ATP plasmatique. Pour des raisons pratiques, cette étude n'a pu être entreprise.

Cet ensemble d'expériences a pu montrer d'une part la rapidité des modifications de concentrations tissulaires de la MAE, et d'autre part qu'une petite variation du taux de S-AMe et de l'activité MAE pouvait indiquer de profondes perturbations métaboliques.

Ces résultats laissent prévoir de très grandes difficultés pour la mise en évidence expérimentale, d'une diminution importante du système S-AMe-MAE, car les perturbations qui seraient provoquées alors, entraîneraient un processus létal.

Les recherches futures devraient permettre de mieux préciser la régulation de ce système chez l'individu normal. Par ailleurs, l'étude de la liaison éventuelle entre les réactions de transméthylation au niveau des tRNA, des infections virales et de la cancérisation, devrait être poursuivie, en utilisant certaines des techniques analytiques que cette thèse a précisées et développées.

x
x x
x

B I B L I O G R A P H I E

- AHLUWALIA G.S., SAXENA Y.R., WILLIAMS H.H. (1968) -
Quantitative studies on selenite metabolism in Escherichia Coli
Arch. Biochem. Biophys. 124, 79-84
- AXELROD J., WEISSBACH H., (1960) -
Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonine to melatonine
Science 131, 1312
- AXELROD J., WEISSBACH H., (1961) -
Purification and properties of hydroxy-indole-O-methyltransferase
J. Biol. Chem. 236, 211-213
- AXELROD J. (1965) -
The formation and metabolism of physiologically active compounds by N and
O-methyltransferase.
In transmethylation and methionine biosynthesis (S.K. SHAPIRO - F. SCHLENK).
p. 71 Univ. Chicago - Press Chicago (1965)
- BACCARI, FIDANZA F., (1948) -
Transmethylation in various organs
Boll. Soc. Ital. Biol. Serpm. 24, 111-112
- BACCINO F.M., SATTÀ G., MAMELI L., (1964) -
Distribution of CCl_4 among liver cell fractions
Biochim. Biophys. Acta 90, 606-608
- BACH S.J. (1945) -
Biological methylation
Biol. Rev. 20, 158-176
- BALDESSARINI R.J., KOPIN J., (1963) -
Assay of tissue levels of S-adenosylmethionine
Anal. Biochem. 6, 289-292

BALDESSARINI R.J. (1965) -

Adenosylmethionine elevation in leukemic white blood cells.

Science 149, 644-645

BALDESSARINI R.J. (1966) -

Alterations in tissue levels of S-adenosylmethionine

Biochem. Pharm. 15, 741-748

BALDESSARINI R.J., KOPIN J. (1966) -

S-adenosylmethionine in brain and other tissues

J. of Neurochem. 13, 769-777

BALDESSARINI R.J., BELL W.R. (1966) -

Methionine-activating enzyme and catechol-O-methyltransferase activity in normal and leukemic white blood cells.

Nature 209, 78-79

BANSHAD J., LERNER A.B. (1964) -

S-adenosylmethionine in skin

J. Invest. Derm. 43, 115-117

BEL A., LEVRAT R., NESMOR J., LEMONTEY A. (1968) -

Evolution comparée de l'ornithine-carbonyl-transférase (O.C.T.) et des transaminases sériques après intoxication aiguë au tétrachlorure de carbone chez le rat.

Rev. Intern. Hépat. 28, 651-661

BOHUON C. (1965) -

Données actuelles sur la biochimie des neuroblastomes

Ann. Biol. Clin. 23, 779-789

BOHUON C., CAILLARD L. (1971) -

S-adenosylmethionine in human blood

Clin. Chim. Acta 33, 222

BREMER J., NATORI Y. (1960) -

Behavior of some selenium compounds in transmethylation
Biochim. Biophys. Acta 44, 367-370

BRUNS F., NEWHAUS J. (1955) -

Glycolytic serum and liver enzyme activities in experimental liver damage
Arch. Biochem. Biophys. 55, 588-591

CANTONI G.L. (1952) -

The nature of the active methyl donor formed enzymically from L-methionine
and adenosine triphosphate
J. Amer. Chem. Soc. 74, 2942-2943

CANTONI G.L., DURELL J. (1957) -

Activation of methionine for transmethylation.

II. The methionine activating enzyme : studies on the mechanism of the reaction
J. Biol. Chem. 225, 1033-1048

CHALLENGER F. (1942) -

Studies on biological methylation VIII B. A summary of recent work on biological methylation and some hypotheses regarding its mechanism.
Chem. Industr. London 61, 456-458

CHALLENGER F. (1951) -

Biological methylation
Advances in enzymologia 12, 429-491

CHASE H.P., VOLPE J.J., LASTER L. (1968) -

Transsulfuration in mammals : fetal and early development of methionine-activating enzyme and its relation to hormonal influences
J. Clin. Investigation 47, 2099-2108

COLLINS A.J., SHARRAT M. (1970) -

The B.H.T. content of human adipose tissue
Fed. Cosmet. Toxicol. 8, 409-412

CORNISH H.H., BLOCK W.D. (1960) -

Carbon tetrachloride. I. Effect of carbon tetrachloride inhalation on rat serum enzymes
Arch. Industr. Health 21, 549-554

CORNISH H.H., RYAN R.C. (1964) -

Carbon tetrachloride. VI. Amino-aciduria in response to carbon tetrachloride inhalation.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 6, 96-102

COX R., SMITH R.C. (1969) -

Inhibition of S-adenosylmethionine formation by analogues of methionine
Arch. Biochem. Biophys. 129, 615-619

CRADDOCK V.M. (1970) -

Transfer RNA methylases and cancer
Nature 228, 1264-1268

CROMWELL B. (1949) -

Microestimation and origin of methylamine in *Mercurialis perennis*
Biochem. J. 45, 84-86

CROMWELL B.T. (1950) -

Microestimation and origin of trimethylamine in *Chenopodium vulvaria*
Biochem. J. 46, 578-581

D'ANGIO G.J., LOKEN M., NESBIT M. (1969) -

Radionuclear (selenium 75) identification of tumor in children with
neuroblastoma
Radiology 93, (3), 615-617

DANIEL J.W., GAGE J.C. (1965) -

The absorption and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) in the rat
Fd. Cosmet. Toxicol. 3, 405

DANIEL J.W., GAGE J.C., JONES D.I., STEVENS M.A. (1967) -

Excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole
(BHA) by man
Fd. Cosmet. Toxicol. 5, 475

DANIEL J.W., GAGE J.C., JONES D.I. (1968) -

The metabolism of 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene in the rat and in man
Biochem. J. 106, 783

DU VIGNEAUD V. (1941) -

Inter-relationships between choline and other methylated compounds
Biol. Symposia 5, 234-247

EICHEL H.J., BUKOVSKY J. (1961) -

Intracellular distribution pattern of rat liver glutamic-oxalacetic transaminases

Nature 191, 243-245

FARBER E., KOCH-WESER D., POPPER H. (1951) -

Influence of sex and of testosterone on fatty liver due to ethionine

Endocrinology 48, 205-212

FARBER E. (1963) -

Ethionine carcinogenesis

Advances in cancer research n° 7, 383-474

FAUVERT R., BOIVIN P. (1964) -

Les enzymes sériques dans les maladies du foie

Enzymologie p. 303-332

L'Expansion Edit. Paris

FIDANZA F., BERARDINIS E. (1948) -

Transmethylation in the crystalline lens I, II

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 24, 687-688 et 1195-1196

FINKELSTEIN J.D. (1967) -

Methionine metabolism in mammals. Effect of age, diet, and hormones on three enzymes of the pathway in rat tissues

Arch. Biochem. Biophys. 122, 583-590

FLEMMING R.M., CLARK W.J. (1965) -

Single extraction method for the simultaneous fluorometric determination of serotonin, dopamine and norepinephrine in brain

Analyt. Chem. 37, 692-696

GAITONDE M.K., GAULL G.E. (1967) -

A procedure for the quantitative analysis of the sulphur amino-acids of rat tissues

Biochem. J. 102, 959-975

GANTHER H.E. (1966) -

Enzymic synthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in mouse liver extracts.

Biochemistry 5, 1089-1098

GILBERT D., GOLDBERG L. (1965) -

Liver response tests - III. Liver enlargement and stimulation of microsomal processing enzyme activity

Fd. Cosmet. Toxicol. 3, 417

GILBERT D., MARTIN A.D. (1967) -

Food antioxidants in tissue culture

Nature 216, 1254

GOLDER W.S., RYAN A.J., WRIGHT S.E. (1962) -

The urinary excretion of tritiated butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in the rat

J. Pharm. Pharmac. 14, 268

GREENBERG D.M. (1963) -

Biological methylation

Advances in enzymology 25, 395-431

Edited by F.F. Nord - Intersciences publishers

GSEGGIN L.R. (1963) -

Cystathioninuria in neuroblastoma

Biochem. J. 89, 42p-43p

HANCOCK R.L. (1966) -

S-adenosylmethionine synthesis activity of normal and neoplastic mouse tissues

Cancer Research 16, 2425-2430

HANCOCK R.L. (1967) -

Utilization of L-méthionine and S-adenosyl-L-methionine for methylation of soluble RNA by mouse liver and hepatoma extracts

Cancer Research 27, 646-653

HIROOKA T., GALAMBOS J.T. (1966) -

Selenium metabolism

I. Respiratory excretion

Biochim. Biophys. Acta 130, 313-320

HIS W. (1887) -

Ueber das Stoffwechsel product des Pyridins

Arch. Exp. Path. Pharmacol. 22, 253-260

HOFMEISTER F. (1894) -

Ueber Methylierung im Thierkörper

Arch. Exp. Path. Pharmacol. 33, 198-215

KNAUFF H.G., WINDSHEINER F. (1960) -

Behavior of total nitrogen and twenty-one free plasma amino-acids in experimental liver damage with carbon tetrachloride.

Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 442-463

KOPIN J., PARE C.M.B., AXELROD J., WEISSBACH H. (1961) -

The fate of melatonin in animals

J. Biol. Chem. 236, 3072-3075

KUANG MEI WANG, TUNG-YUE WANG (1964) -

Intra-nuclear distribution of transaminases

Nature 204, 880-881

LADOMERY L.G., RYAN A.J., WRIGHT S.E. (1963) -

The urinary excretion of ^{14}C labelled butylated hydroxytoluene by the rat

J. Pharm. Pharmacol. 15, 771

LERNER A.B., CASE J.D., HEINZELMAN W. (1959) -

Structure of melatonin

J. Am. Chem. Soc. 81, 6084

LERNER A.B., CASE J.D. (1960) -

Melatonin

Fed. Proc. 19, 590-592

LERNER A.B., CASE J.D., TAKAHASHI Y. (1960) -

Isolation of melatonin and 5-methoxy-indole-3-acetic acid from bovine pineal glands

J. Biol. Chem. 235, 1992-1997

LEVINE M., TARVER H. (1951) -

Ethionine. III. Incorporation of ethionine into rat proteins

J. Biol. Chem. 192, 835-850

LIEN SHOU., PAN F., SING FIE CLIM (1969) -

Pancreatic hormones and hepatic methionine adenosyltransferase in the rat
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 1012-1018

LORIETTE Cl. , RAULIN J. (1968) -

Sort des antioxygènes dans l'organisme et rôle biologique du sélénium
Ann. Nutr. Alim. 22, 93-130

LOWRY O.H., ROSERBROUGH N., FARR N., RANDALL R. (1951) -

Protein measurement with the Folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275

Mac CONNEL, KENNETH P., ROTH D.M. (1966) -

Respiratory excretion of selenium

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 919-921

MAUBILLE A., PIRET L. (1969) -

Etude in vitro et in vivo de la concentration de la sélénométhionine ⁷⁵Se
dans une tumeur surrénalienne

Ann. Endocrinol. (Paris) 30, 324-327

MAY L., MIYAZAKI M., GRENNELL R.G. (1959) -

Distribution of glutamic-oxaloacetic acid transaminase in rat brain

J. Neurochem. 4, 269

MOORE B.G. and al. (1969) -

S-adenosylethionine as an inhibitor of tRNA methylation
Canad. J. Biochem. 47, 561-565

MUDD S.H., CANTONI G.L. (1958) -

Activation of methionine for transmethylation
III. The methionine activating enzyme of baker's yeast
J. Biol. Chem. 231, 481-492

MUDD S.H. (1959) -

Enzymatic cleavage of S-adenosylmethionine
J. Biol. Chem. 234, 1784-1786

MUDD S.H. (1962) -

Activation of methionine for transmethylation
V. The mechanism of action of the methionine activating enzyme
J. Biol. Chem. 237, Pc 1372-1375

MUDD S.H. (1963) -

Activation of methionine for transmethylation
VI. Enzyme bound tripolyphosphate as an intermediate in the reaction catalysed by the methionine
Activating enzyme of baker's yeast.
J. Biol. Chem. 238, 2156-2163

MUDD S.H., CANTONI G.L. (1964) -

Biological transmethylation methyl group neogenesis and other "one carbon" metabolic reactions dependant upon tetrahydrofolic acid.
In comprehensive biochemistry vol. 15 group transfer reaction edited by Florkin M. Stotz. Edit. Elsevier - Amsterdam p. 1

MUDD S.H. (1965) -

The mechanism of the enzymatic synthesis of S-adenosylmethionine. In Transmethylation and methionine biosynthesis.
S.K. Shapiro and F. Schlenk Editors. p. 33
University of Chicago Press.

MUDD S.H., FINKELSTEIN J.D., IRREVERRE F., LASTER L., (1965)

Transsulfuration in mammals. Microassays and tissue distributions of three enzymes of the pathway.
J. Biol. Chem. 240, 4382-4392

NATORI Y. (1963) -

Studies on Ethionine

VI. Sex-dependent behavior of methionine and ethionine in rats

J. Biol. Chem. 238, 2075-2080

NOTARBARTOLO A., GIGLIO F., LE MOLI S., MIGNECO G., PAGLIARO L. (1966) -

Mitochondrial and cytoplasmic enzymes in the serum of patients with liver disease

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 42, 328-331

OKAZAKI K., SHULL K.H., FARBER E. (1968) -

Effects of ethionine on adenosine triphosphate levels and ionic composition of liver cell nuclei.

J. Biol. Chem. 243, 4661-4666

OLCOTT H.S., DUANE BROWN W., VAN DER VEEN J. (1961) -

Selenomethionine as an antioxidant

Nature 191, 1201-1202

PAGE I., ISAAC V.M. Mc, (1958)

The metabolism of serotonin (5-hydroxytryptamine)

J. Biol. Chem. 234, 857-864

PAN F., TARVER H. (1967)^a

Effects of diet and other factors on methionine adenosyltransferase levels in rat liver

The Journal of Nutrition 92, 274-280

PAN F., TARVER H. (1967)^b

Comparative studies on methionine, selenomethionine, and their ethyl analogues as substrates for methionine adenosyltransferase from rat liver.

Arch. Biochem. Biophys. 119, 429-434

PAN F., SHIH CHING LEE, GU-GUANG-CHANG, CHIN SING FIE (1968)^a

Gonadal hormones in the regulation of methionine adenosyltransferase levels in rat liver

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129, 161-165

PAN F., GU-GANG-CHANG, SHIH CHING LEE, MENG SHIANG TANG (1968)^b -

Induction of methionine adenosyltransferase in rat liver by corticosteroids
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 611-616

PARKS C., SCHLENK F. (1958) -

The stability and hydrolysis of S-adenosylmethionine
Isolation of S-ribosylmethionine
J. Biol. Chem. 230, 295-305

PASCAL G., TERROINE T. (1969)^a -

Effets biochimiques et physiologiques d'un additif alimentaire le di-tertio-
butyl-hydroxy-toluène (B.H.T.)
Ann. Nutr. Alim. 23, 15-62

PASCAL G., KARSENTY J.C., MIGUET S. (1969)^b -

Effets de l'ingestion du butyl-hydroxy-toluène (B.H.T.) sur l'activité
de la phosphatase acide du foie de rat
Ann. Nutr. Alim. 23, 73-101

PEGG A.E., ASHMAN H.G.W. (1969) -

On the role of S-adenosylmethionine in the biosynthesis of spermidine by
rat prostate
J. Biol. Chem. 244, 682-693

PIGG C.J., SPENCE K.D., PARKS L.W. (1962) -

Methionine biosynthesis in yeast
Arch. Biochem. 97, 491-496

REES K.R., SINHA K.P. (1960) -

Blood enzyme levels in liver injury
J. Path. Bact. 80, 297-307

REMY C.N. (1959) -

Metabolism of 2,6 diaminopurine : S-adenosylmethionine as methyl donor for
2-methylamino-6-aminopurine synthesis
J. Biol. Chem. 234, 1485-1491

REMY C.N. (1961) -

Metabolism of 6-methylaminopurine : synthesis and demethylation by
Escherichia Coli

J. Biol. Chem. 236, 2999-3005

REMY C.N. (1963)

Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines S-methylation with S-
adenosyl methionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues

J. Biol. Chem. 238, 1078-1084

ROQUEBERT J., CANELIAS J., VITTE G. (1963) -

Toxicité aiguë du sélénite de sodium

Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 102, 207-212

SCALA J., WILLIAMS H.H. (1962) -

The enhancement of selenite toxicity by methionine in Escherichia Coli

Arch. Biochem. Biophys. 99, 363-368

SCHLENK F., PALMA De (1957) -

The formation of S-adenosylmethionine in yeast

J. Biol. Chem. 229, 1037-1050

SCHLENK F., PALMA De (1957) -

The preparation of S-AMe

J. Biol. Chem. 229, 1051-1057

SCHULTZ J., LEWIS H.B. (1940) -

The excretion of volatile selenium compounds after the administration of
sodium selenite to white rats

J. Biol. Chem. 133, 199-207

SHAPIRO S.K., LOHMAR P., HERTENSTEIN M. (1963) -

Utilization of S-adenosylmethionine for the biosynthesis of methionine

Arch. Biochem. Biophys. 100, 74-79

SHAPIRO S.K., YPHANTIS D.A., ALMENAS A. (1964) -

Biosynthesis of methionine in *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and properties of S-Adenosylmethionine-homocysteine-methyltransferase
J. Biol. Chem. 239, 1551-1556

SHAPIRO S.K., EHRNIFER D.J. (1966) -

Methods for the analysis and preparation of adenosylmethionine and adenosylhomocysteine
Anal. Biochem. 15, 323-333

SHULL K.H., Mc CONOMY J., VOGT M., CASTILLO A., FARBER E. (1966) -

On the mechanism of induction of hepatic adenosine triphosphate deficiency by ethionine
J. Biol. Chem. 241, 5060-5070

SMITH R.C., SALMON W.D. (1965) -

Formation of S-adenosylethionine by ethionine-treated rats
Arch. Biochem. Biophys. 111, 191-196

SPENCE K.D., SHAPIRO S.K. (1967) -

Some novel mutants of *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by adenosylmethionine and adenosylhomocysteine
J. Bact. 94, 1136-1142

STEKOL J.A., WEISS S., SOMERVILLE C. (1963) -

A study of the comparative metabolism of ethionine and methionine in the male and female rat
Arch. Biochem. Biophys. 100, 86-90

SZALKOWSKI C.R., GARBER J.B. (1962) -

Determination of 2,6 di-tert-butyl-4-hydroxy-toluene (B.H.T.)
Application to edible fats and oils
J. Agric. Fd. Chem. 10, 490

TAYLOR R.T., WEISSBACH H. (1967) -

N^5 methyl-tetrahydrofolate homocysteine transmethylase
Role of S-AMe in vit. B12 dependent methionine synthesis
J. Biol. Chem. 242, 1517-1521

TAYLOR R.T., WHITFIELD C., WEISSBACH H. (1968) -

Chemical propylation of vitamine B 12 transmethyrase : anormalous
behavior of S-adenosyl-L-methionine

Arch. Biochem. 125, 240-252

THOMAS H. (1969) -

On methylation processes in metabolism

Med. Welt. 8, 383-387

TRUHAUT R., DELARUE J.C. (1965) -

Modifications des taux plasmatiques des amino-acides libres au cours de
l'intoxication aiguë du rat par le tétrachlorure de carbone

Ann. Biol. Clin. 23, 65-72

TRUHAUT R., CAILLARD L., BOHUON C. (1970) -

Présence de la méthionine-S-adenosyltransférase dans le sang de rats
intoxiqués par le tétrachlorure de carbone

C.R. Acad. Sc. Paris 270, 2993-2995

TSUTSUI E., SRINIVASAN R., BORECK E. (1966) -

tRNA-methylases in tumors of animal and human origin

Proc. Nat. Acad. Sc. 56, 1003-1009

VILLA L. (1966) -

Investigations of liver enzymology : towards on organic enzymologic semio-
logy

Recenti Progr. Med. 40, 1-20

WRIGHT A.S., AKINTONWA D.A.A., CROWNE R.S., HATHWAY D.E. (1965) -

The metabolism of 2,6 di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol (Ionox 100)
in the dog and rat

Biochem. J. 97, 303

WURTMAN R.J., AXELROD J. (1965) -

The pineal gland

Sci. Amer. 213, 50-60

ZAPPIA V., ZYDEK-CWICK C.R., SCHLENK F. (1969) -

Specificity of S-adenosyl-L-methionine sulfonium stereo-isomers, in some enzyme systems.

Biochim. Biophys. Acta 178, 185-187

ZIMMERMAN H.J., KODERA Y., WEST M. (1965) -

- Rate of increase in plasma levels of cytoplasmic and mitochondrial enzymes in experimental CCl_4 hepatotoxicity

J. Lab. Clin. Med. 66, 315-323

- Effects of CCl_4 poisoning on the plasma levels of cytoplasmic and mitochondrial enzymes in animals with nutritional fatty metamorphosis

J. Lab. Clin. Med. 66, 324-333

x
x x
x

